

Anticuerpos anormales contra los carbohidratos propios en pacientes infectados por SARS-CoV-2

Dorothy L. Butler y Jeffrey C. Gildersleeve *

Laboratorio de Biología Química, Centro de Investigación del Cáncer, Instituto Nacional del Cáncer,
Frederick, MD,

7-02-21

*Autor para correspondencia y contacto principal: gildersj@mail.nih.gov

Título corto: Anticuerpos anormales contra los carbohidratos propios en pacientes con COVID-19

RESUMEN

El SARS-CoV-2 es un virus mortal que está causando la enfermedad pandémica mundial por coronavirus 2019 (COVID-19). Nuestro sistema inmunológico juega un papel crítico en la prevención, eliminación y tratamiento del virus, pero las respuestas inmunes aberrantes pueden contribuir a los síntomas nocivos y la mortalidad. Se están investigando muchos aspectos de las respuestas inmunitarias al SARS-CoV-2, pero se sabe poco sobre las respuestas inmunitarias a los carbohidratos. Dado que la superficie del virus está fuertemente glicosilada, los anticuerpos preexistentes contra los glicanos podrían reconocer el virus e influir en la progresión de la enfermedad. Además, las respuestas de anticuerpos a los carbohidratos podrían ser inducidas, afectando la gravedad de la enfermedad y el resultado clínico. En este estudio, utilizamos un microarray de antígeno carbohidratado con más de 800 componentes individuales para perfilar anticuerpos antiglicano séricos en pacientes con COVID-19 y sujetos de control sanos. En pacientes con COVID-19, observamos anticuerpos IgG e IgM anormalmente altos contra numerosos autoglicanos, incluidos gangliósidos, glicanos ligados a *N*, glicanos que contienen LacNAc, grupo sanguíneo H y sialyl Lewis X. Se sabe que algunos de estos anticuerpos antiglicano desempeñan funciones en enfermedades autoinmunes y trastornos neurológicos, lo que puede ayudar a explicar algunos de los síntomas únicos y prolongados observados en pacientes con COVID-19. La detección de anticuerpos contra los autoglicanos tiene implicaciones importantes para el uso de suero convaleciente para tratar a los pacientes, el desarrollo de vacunas seguras y efectivas contra el SARS-CoV-2 y la comprensión de los riesgos de

infección. Además, este estudio proporciona una nueva visión de las respuestas inmunes al SARS-CoV-2 e ilustra la importancia de incluir antígenos de carbohidratos virales y del huésped al estudiar las respuestas inmunes a los virus.

Introducción

COVID-19 es una enfermedad respiratoria causada por el coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2). En menos de un año, este virus ha causado más de 1 millón de muertes en todo el mundo y se ha convertido en la tercera causa de muerte en los Estados Unidos.¹ Más allá del grave impacto en la salud humana, el SARSCoV-2 ha causado importantes trastornos en muchos aspectos de la vida, incluida la economía, la educación, los viajes y la vida personal. Como resultado, se está llevando a cabo un esfuerzo mundial sin precedentes para desarrollar métodos efectivos para prevenir y tratar la COVID-19. Debido a que se trata de un virus infeccioso nuevo y emergente, falta gran parte del conocimiento fundamental que proporciona la base para el desarrollo de vacunas y agentes terapéuticos, así como para tomar decisiones informadas de salud pública. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de mejorar nuestra comprensión básica de cómo funciona el virus, por qué causa resultados graves de la enfermedad y cómo podemos intervenir para proteger la vida humana.

Uno de los aspectos más desconcertantes de la enfermedad es que puede causar una gran cantidad de síntomas además de dificultad respiratoria, que a menudo involucran múltiples órganos aparte de los pulmones. Por ejemplo, los pacientes con COVID19 pueden sufrir una variedad de síntomas neurológicos, que incluyen encefalopatía, psicosis, síndrome neurocognitivo y dolor de cabeza.²⁻⁵ Más allá de afectar las funciones neurológicas, también se ha informado que las infecciones por SARS-CoV-2 afectan a los sistemas cardiovascular y gastrointestinal.⁶⁻⁹ Un problema especialmente preocupante es que algunos síntomas pueden durar meses más allá de la infección primaria, incluso en ausencia de virus detectables.¹⁰⁻¹² Esto no está claro por qué algunos pacientes, a menudo denominados "transportistas de larga distancia", tienen efectos prolongados. En términos más generales, los mecanismos específicos que conducen a síntomas dispares y daño en múltiples órganos no se entiende.

Nuestro sistema inmunológico desempeña un papel fundamental en la prevención, eliminación y tratamiento del SARS-CoV-2. Por lo tanto, comprender las respuestas inmunes del huésped al SARS-CoV-2 es esencial para desarrollar terapias y vacunas efectivas para controlar esta **pandemia**. Si bien la respuesta inmune puede involucrar muchos elementos de los brazos innatos y adaptativos del sistema inmune, las respuestas de anticuerpos son una de las características más importantes. La mayoría de los pacientes desarrollan una respuesta robusta de anticuerpos al virus, y la presencia de estos anticuerpos se puede utilizar como un indicador de infección reciente.¹³⁻¹⁵ La presencia de anticuerpos neutralizantes en pacientes en recuperación también se ha aprovechado para el tratamiento de nuevas infecciones mediante la administración de suero convaleciente.¹⁶⁻¹⁹ Los anticuerpos monoclonales neutralizantes aislados de pacientes o identificados mediante técnicas *in vitro* se encuentran actualmente en ensayos clínicos para el tratamiento de la COVID-19.²⁰⁻²² Además, la generación de una respuesta vigorosa de anticuerpos es un objetivo clave para el desarrollo de una vacuna eficaz. Por estas razones, una comprensión profunda de las respuestas de anticuerpos al SARS-CoV-2, así como a las vacunas, es vital para estos objetivos.

Si bien a menudo son beneficiosas, las respuestas inmunes demasiado agresivas y / o aberrantes también pueden ser dañinas en pacientes con COVID-19.²³⁻²⁵ Por ejemplo, la inflamación excesiva se ha asociado con efectos respiratorios graves y síntomas perjudiciales.^{26,27} El conocimiento de este problema ha llevado al uso de agentes antiinflamatorios, como la dexametasona, para reducir significativamente la mortalidad en pacientes con COVID-19.²⁸ La evidencia emergente indica que el SARS-CoV-2 también puede inducir autoanticuerpos. Por ejemplo, se han identificado autoanticuerpos en niños que han tenido previamente COVID-19 y han recaído con síndrome multiinflamatorio.²⁹ Otros estudios han demostrado

autoanticuerpos contra una variedad de proteínas en pacientes adultos con síntomas graves de COVID-19 o síntomas neurológicos.³⁰⁻³² También se han observado autoanticuerpos contra ciertos gangliósidos en un subconjunto de pacientes con COVID-19 con síntomas relacionados con el síndrome de Guillain-Barré (GBS).^{33,34} Por último, ciertas respuestas de anticuerpos en realidad pueden mejorar la infección,³⁵ pero los mecanismos de mejora dependiente de anticuerpos no se comprenden bien. Por estas razones, estudiar la respuesta inmune del huésped, especialmente la respuesta de anticuerpos, también es fundamental para comprender las complicaciones que pueden surgir de una respuesta inmune demasiado agresiva y para desarrollar intervenciones para eludir estos problemas.

Numerosos nuevos grupos han estado estudiando las respuestas inmunes al SARS-CoV-2, y una gran cantidad de la información está surgiendo.^{23-25, 29, 30, 32, 36-44} Aunque se están descubriendo las funciones de varias células, citoquinas y anticuerpos contra las proteínas, se sabe relativamente poco sobre las respuestas inmunes a los carbohidratos. Algunos informes recientes han demostrado una pequeña correlación con el tipo de sangre ABO y la susceptibilidad a COVID-19, y este efecto puede involucrar anticuerpos séricos preexistentes contra los carbohidratos del grupo sanguíneo A (BG-A) y / o del grupo sanguíneo B (BG-B).³⁶⁻³⁹ Otro estudio reciente informó de una relación inversa entre la gravedad de la enfermedad COVID-19 y los anticuerpos séricos anti- α -Gal.⁴⁵ **α -Gal es un glicano no humano, y los anticuerpos naturales contra este epítipo de glicano pueden ser parte de la respuesta protectora a los virus patógenos, bacterias y parásitos que contienen este glicano.**⁴⁵⁻⁴⁸ Además de estos estudios sobre anticuerpos antihidratos de carbono séricos, **varios estudios han demostrado que la proteína espiga del SARS-CoV-2 está fuertemente glicosilada.**⁴⁹⁻⁵⁴ **El mapeo de glicosilación de las subunidades de la proteína espiga reveló una variedad de glicanos ligados a O y N, incluida la alta manosa.**⁵⁰ Estos glicanos pueden ser reconocidos por 2G12, un anticuerpo que se dirige a los glicanos de manosa alta en gp120 del VIH.⁵⁵ **En conjunto, estos estudios sugieren que los glicanos y los anticuerpos antiglicanos pueden desempeñar un papel importante en la prevención, el tratamiento y la gravedad de la COVID-19.**

Para comprender mejor las funciones de los glicanos en la respuesta inmune al SARS-CoV-2, comparamos los repertorios séricos de anticuerpos IgG e IgM antiglicanos de 40 pacientes con COVID-19 con 20 sujetos de control no infectados. Para monitorear una variedad grande y diversa de poblaciones de anticuerpos, perfilamos cada muestra de suero utilizando un micro radiografía de antígeno de carbohidratos con más de 800 componentes. Estos estudios revelaron que los pacientes con COVID-19 tenían diferencias sustanciales en los anticuerpos antiglicanos, incluidos los anticuerpos inusuales contra una variedad de autoglicanos.

Resultados

Diseño del estudio

En el estudio se utilizó suero de 40 pacientes infectados por SARS-CoV-2 y 20 individuos no infectados. Todas las muestras de suero de control se recogieron antes de diciembre de 2019, cuando comenzó el brote de SARS-CoV2. Hubo 20 individuos masculinos y 20 femeninos en la cohorte COVID-19, y hubo 13 individuos masculinos y 7 femeninos en el grupo de control. Todos los pacientes de la cohorte COVID-19 tuvieron una prueba de anticuerpos positiva para IgG, IgM o ambas al dominio de unión al receptor de proteína espiga utilizando un ELISA indirecto. Todos los pacientes eran sintomáticos, pero los detalles sobre los síntomas específicos y los resultados no estaban disponibles en el momento de este estudio. La edad promedio de los pacientes infectados con SARS-CoV-2 fue de 64 años, con un rango de edad de 41-92 años. Los individuos de control no infectados tenían una edad promedio de 40 años, con

un rango de edad de 18 a 65 años. Esta diferencia de edad entre el grupo de control y el grupo positivo de COVID-19 puede tener cierta influencia en los resultados (ver más abajo).

Para evaluar los repertorios anti-glicanos de pacientes con COVID-19, se perfiló IgG e IgM a partir de muestras de suero en una micro radiografía de carbohidratos que contiene 816 componentes. El microarray incluía una colección diversa de glicanos ligados a *N* y *O*, glicolípidos, glicopéptidos, glicanos bacterianos y fúngicos, y algunas glicoproteínas naturales. Este conjunto de glicanos permite la rápida proliferación de una amplia gama de poblaciones de anticuerpos antiglicanos en suero, incluidos los de antígenos extraños y autoantígenos.

Las señales de anticuerpos de cada paciente con COVID-19 se compararon con el conjunto de control para identificar señales inusuales.

Los perfiles globales revelan señales de IgM significativamente más bajas en pacientes positivos para sars-CoV-2

Comenzamos evaluando las señales generales de anticuerpos en toda la matriz para evaluar las diferencias globales en los niveles de anticuerpos en las muestras de pacientes de control y COVID-19 y para proporcionar un contexto para las diferencias individuales. Medimos las señales medias de IgG e IgM de todos los componentes de la matriz para cada cohorte de muestras

(Figura 1). Para casi todos los glicanos, excepto algunos detallados a continuación, las señales medias de IgM a los glicanos fueron de 2 a 4 veces más bajas en los pacientes con SARS-CoV-2 positivo en comparación con los controles, mientras que las señales medias de IgG totales fueron similares. En toda la matriz, las señales promedio de IgM en el grupo de control fueron 2.3 veces más altas que las de los pacientes con COVID-19. Para determinar si este efecto fue específico de la IgM que se une a los carbohidratos o debido a las diferencias en los niveles séricos totales de IgM, se midió la IgM total en todas las muestras. La IgM total promedio en las muestras de pacientes con COVID-19 fue un 30% menor que la IgM total promedio en las muestras de control (Figura suplementaria S1). Por lo tanto, las diferentes necesidades en IgM total solo explican parcialmente las señales de IgM sustancialmente más bajas observadas en la matriz en pacientes positivos para SARS-CoV-2. Anteriormente hemos observado grandes disminuciones en la IgM de unión a carbohidratos con el aumento de la edad.⁵⁶ Por lo tanto, es probable que las diferencias en las edades medias de cada población de la muestra también contribuyan.

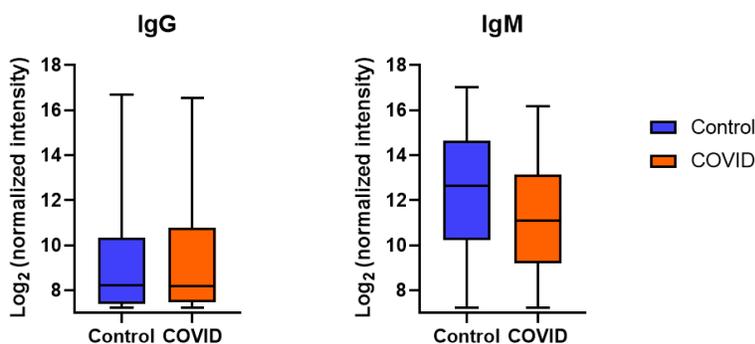


Figura 1: Señales promedio de anticuerpos IgG e IgM para todos los glicanos. Diagramas de caja y bigotes de las señales promedio (base logarítrica 2) a todos los componentes de la matriz para anticuerpos IgG e IgM de muestras de suero de control y COVID-19.

IgG inusualmente alta a glicolípidos en pacientes positivos para SARS-CoV-2

Una diferencia notable entre las muestras de suero de pacientes con COVID-19 y los controles sanos fueron los anticuerpos inusualmente altos contra los glicolípidos glicolípidos (ver Figura 2 y Figura suplementaria S2). Inusualmente alto se definió como una señal que era mayor que 6 desviaciones estándar por encima del mean del grupo de control y mayor de 10 veces por encima del valor mínimo para nuestro ensayo. Si bien es muy poco común en individuos sanos, los anticuerpos antiglicolípidos a menudo se encuentran en poblaciones que tienen enfermedades autoinmunes y otras disfunciones del sistema nervioso.⁵⁷ Por ejemplo, los anticuerpos contra asialo-GM1, GM1a, GD1a y GD1b se observan con frecuencia en pacientes con síndrome de Guillain-Barré (SGB). Observamos anticuerpos inusualmente altos contra los glicanos de GBS en el 15% de los pacientes (Figura 2A). Se observaron señales aún mayores en varios otros glicolípidos no asociados con GBS, como GD3, fucosil-GM1, GM2 y GM3 (ver Figura 2B). Las señales de anticuerpos más grandes para GD3 y fucosil-GM1 en pacientes con COVID-19 fueron >35 veces más altas que las señales más grandes en el grupo de control. Aunque los humanos no biosintetizan Neu5Gc, se puede obtener a través de fuentes dietéticas e incorporarse a los glicanos de la superficie celular;⁵⁸ por lo tanto, hemos incluido la variante Neu5Gc de GD2 [#505; GD2 (Gc/Gc)] con este grupo (ver Figura 2B). Al considerar todos los glicolípidos (GBS y no GBS), 14 pacientes (35%) tenían anticuerpos altos contra al menos un glicolípidos. Las señales de anticuerpos a los gangliósidos no se correlacionaron con los títulos de IgG a la proteína espiga.

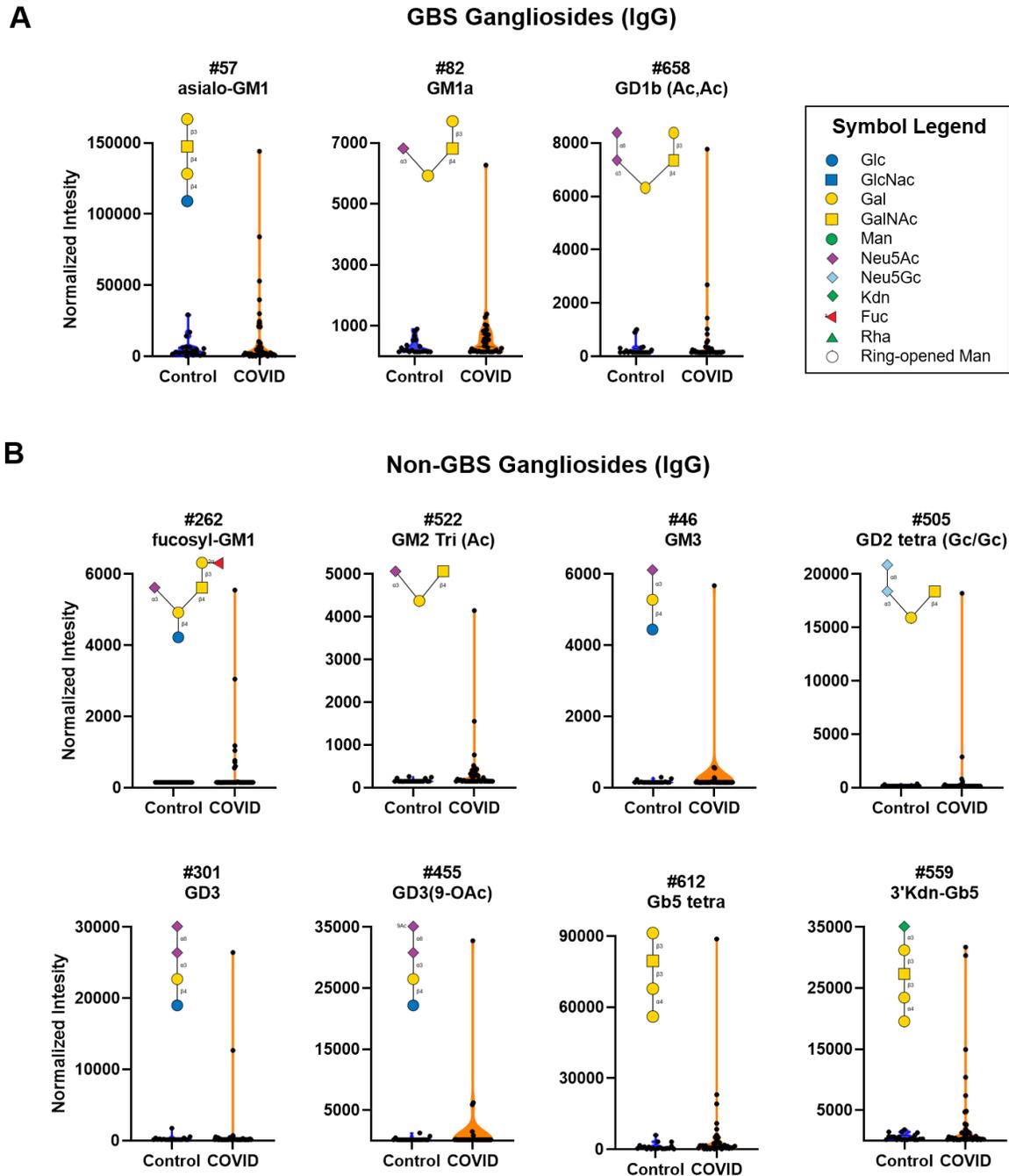


Figura 2. Señales altas de anticuerpos para seleccionar glicanos gangliósidos en suero de pacientes con COVID-19. Gráficos de violín que muestran señales altas de IgG a varios gangliósidos / glicolípidos para pacientes con COVID-19 versus sujetos de control, con cada punto representando datos de un paciente individual: **A)** Gangliósido asociado al síndrome de Guillain-Barré (GBS) y **B)** otros gangliósidos / glicolípidos. Ver Figura 6 para pacientes con señales a múltiples glicanos. Las estructuras de glicanos se crearon utilizando Gliglifo.⁵⁹

Señales de anticuerpos séricos inusualmente altas para oligomanosa y otros glicanos ligados a N en pacientes positivos para SARS-CoV-2

Además de los anticuerpos contra los glicolípidos, también observamos señales de IgG inusualmente grandes a glicanos ligados a N y fragmentos de oligomanosa de ciertos glicanos ligados a N (ver Figura 3, Figura 4, Figura suplementaria S3 y S4). Los glicanos ligados a N son abundantes en el cuerpo humano, y también cubren las proteínas espiga del SARS-CoV-2. Nuestra matriz contiene aproximadamente 30 glicanos diferentes ligados a N, incluidos glicanos N de alta manosa, complejos e híbridos. En general, hubo muy pocas o ninguna señal medible para los glicanos ligados a N en el grupo de control. En contraste, hubo una variedad de señales de anticuerpos séricos notablemente altas a varios glicanos ligados a N en los pacientes positivos para SARS-CoV-2 (ver Figura 3 y Figura S3). Las señales IgG más grandes e inusuales fueron a NGA4, un complejo tetraantenario N-glicano con la siguiente secuencia: $\text{GlcNAc}\beta\text{1-2}(\text{GlcNAc}\beta\text{1-6})\text{Man}\alpha\text{1-6}[\text{GlcNAc}\beta\text{1-2}(\text{GlcNAc}\beta\text{1-4})\text{Man}\alpha\text{1-3}]\text{Man}\beta\text{14GlcNAc}\beta$. Cuatro pacientes tenían anticuerpos altos contra NGA4, y la mayor señal contra NGA4 en el COVID-19

el grupo fue más de 40 veces mayor que la señal más grande en el grupo de control. Curiosamente, solo un paciente tenía altas señales de anticuerpos al correspondiente riantenano N-glicano, NGA3 ($\text{GlcNAc}\beta\text{1-2Man}\alpha\text{16}[\text{GlcNAc}\beta\text{1-2}(\text{GlcNAc}\beta\text{1-4})\text{Man}\alpha\text{1-3}]\text{Man}\beta\text{1-4GlcNAc}$), y ninguno tenía señales altas para el N glicano bicatenario NGA2 ($\text{GlcNAc}\beta\text{1-2Man}\alpha\text{1-6}(\text{GlcNAc}\beta\text{1-2Man}\alpha\text{1-3})\text{Man}\beta\text{1-4GlcNAc}$). Además, no se observaron señales altas de IgG para NGA3B ($\text{GlcNAc}\beta\text{1-2Man}\alpha\text{1-6}[\text{GlcNAc}\beta\text{1-2}(\text{GlcNAc}\beta\text{1-4})\text{Man}\alpha\text{1-3}](\text{GlcNAc}\beta\text{14})\text{Man}\beta\text{1-4GlcNAc}$). Estos resultados indican una respuesta específica a NGA4 y NGA3, en lugar de una respuesta inespecífica o polirreactiva. Además de NGA4, varios pacientes tenían señales altas de IgG a Man6-I, una manosa alta *N-glicano* con la secuencia: $\text{Man}\alpha\text{1-6}(\text{Man}\alpha\text{1-3})\text{Man}\alpha\text{1-6}(\text{Man}\alpha\text{1-2Man}\alpha\text{1-3})\text{Man}$. También es de destacar que un paciente mostró una señal de IgG inusualmente alta a dos N-glicanos si alquilados bicatenarios: "A2 (a2-3)" con la secuencia $\text{Neu5Ac}\alpha\text{2-3Gal}\beta\text{1-4GlcNAc}\beta\text{1-2My}\alpha\text{1-6}(\text{Neu5Ac}\alpha\text{2-3Gal}\beta\text{1-4GlcNAc}\beta\text{1-2Man}\alpha\text{1-3})\text{Man}\beta\text{1-4GlcNAc}\beta$, y "A2 (a2-6)" con la secuencia $\text{Neu5Ac}\alpha\text{2-6Gal}\beta\text{1-4GlcNAc}\beta\text{1-2Man}\alpha\text{16}(\text{Neu5Ac}\alpha\text{2-6Gal}\beta\text{1-4GlcNAc}\beta\text{1-2Man}\alpha\text{1-3})\text{Man}\beta\text{1-4GlcNAc}\beta$. En general, el 17,5% de los pacientes con COVID-19 tenían señales altas de IgG a 1 o más glicanos ligados a N y el 10% tenían señales altas de IgG a 2 o más glicanos ligados a N. También se observaron señales anormalmente altas a los glicanos ligados a N para IgM, como anticuerpos contra A2 (a2-6), Man6-I y Man9 (ver Figura 3B). La mayoría de los pacientes con IgM a *N-glicano* saltos eran distintos de los pacientes que tenían IgG a *N-glicano* saltos; sólo tres pacientes tenían IgG alta y IgM alta a N-glicanos. Las señales altas de anticuerpos contra los N-glicanos son especialmente notables dado que las señales totales de IgM e IgM a la gran mayoría de los otros glicanos fueron más bajas para los pacientes con COVID-19. Ni las señales de IgG ni IgM a los glicanos ligados a N se correlacionaron con títulos a la proteína espiga.

También observamos señales de IgG anormalmente altas para una variedad de glicanos oligomanosa (ver Figura 4 y Figura S4). Estos glicanos son subestructuras o fragmentos de varios glicanos ligados a N. Las señales de IgG para estos glicanos son típicamente bajas en sujetos sanos y fueron bajas en nuestro grupo de control. Ciertos pacientes, sin embargo, tenían señales muy altas a estos glicanos. Las señales más grandes fueron a los glicanos oligomanosa que contenían un $\text{Man}\alpha\text{1-2Man}\alpha$ secuencia $\text{1-3Man}\alpha\text{1-6}$, pero también se observaron señales altas a varias otras variantes. En general, el 52,5% de los pacientes con COVID-19 tenían señales altas a 1 o más fragmentos de oligomanosa, y el 37,5% tenía señales altas a 2 o más fragmentos de oligomanosa. Hubo una asociación positiva de una mayor señal de IgG para los fragmentos de oligomanosa con la edad. No se observó correlación con los títulos de IgG con la proteína espiga. Para las señales de anticuerpos IgM, solo hubo pequeñas diferencias para los fragmentos de oligomanosa.

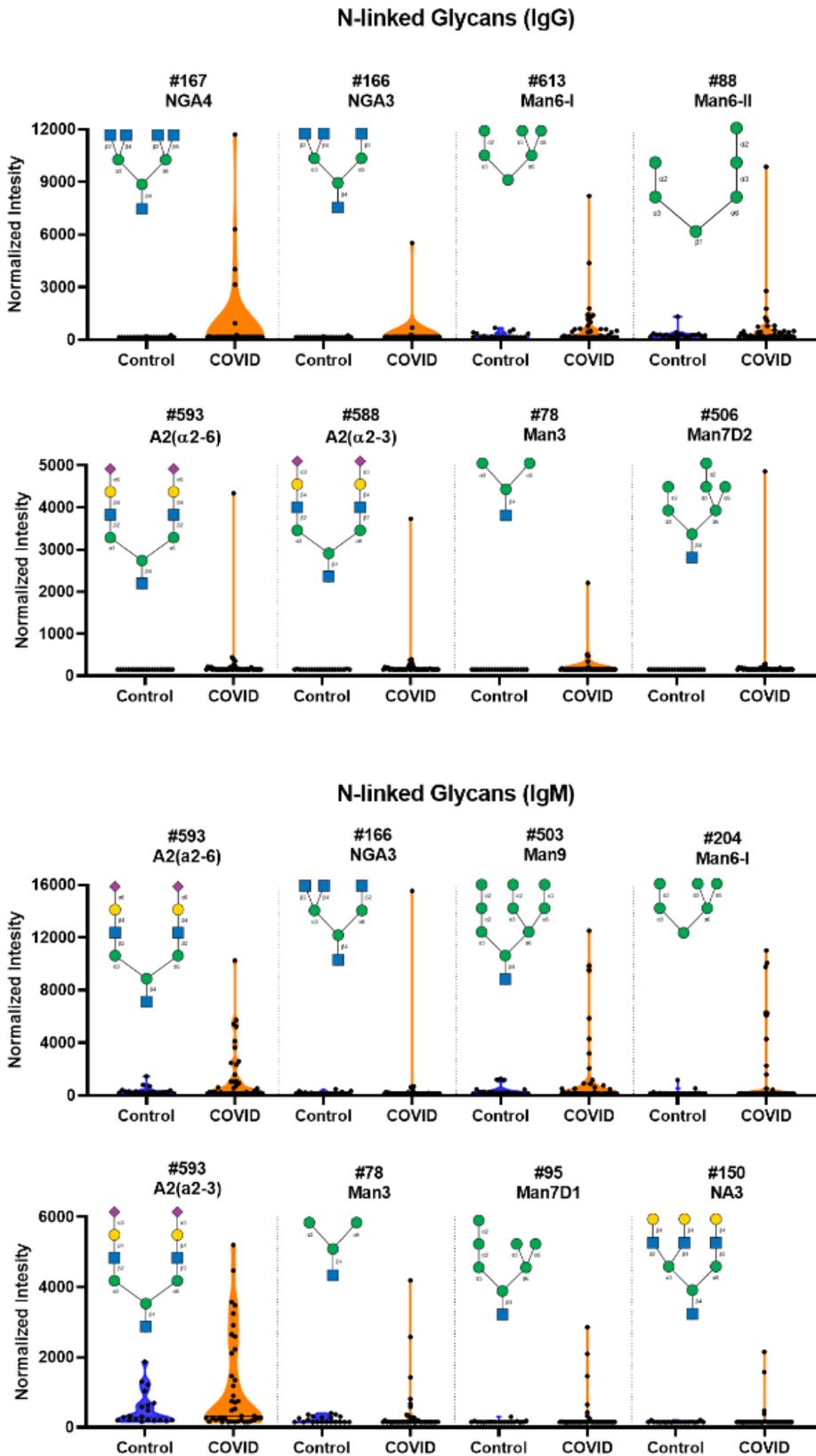


Figura 3. Señales altas de IgG e IgM para seleccionar glicanos ligados a N en suero de pacientes con COVID-19. A) Los gráficos muestran varias señales de IgG alta para seleccionar componentes de la matriz de glicanos ligados a N para el suero de pacientes con COVID-19 en comparación con las señales basales observadas en el suero de donantes de control, y cada punto representa los datos de un paciente individual. B) Las gráficas muestran varias señales de IgM alta para seleccionar componentes de matriz de glicanos ligados a N para el suero de pacientes con COVID-19 en comparación con las señales de referencia observadas en el suero de donantes de control. Consulte Clave de símbolo en la Figura 1. Vea la Figura 6 para pacientes con señales a múltiples. Las estructuras de glicanos se crearon utilizando Gliglifo.⁵⁹

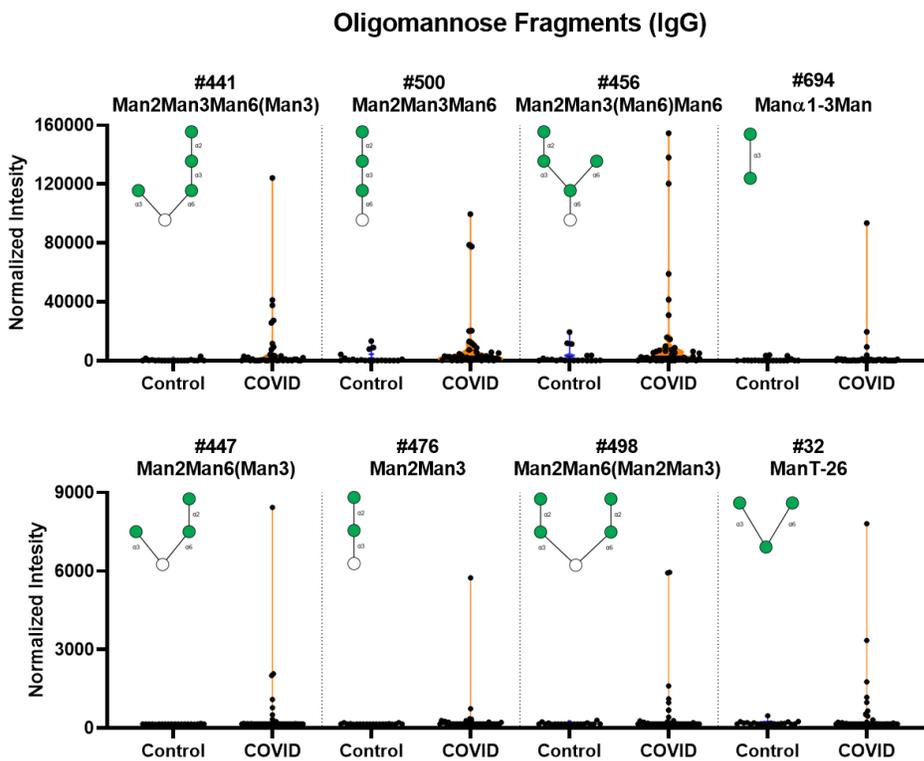


Figura 4. Señales de IgG alta para seleccionar fragmentos de oligomanosa en suero de pacientes con COVID-19. Los gráficos de muestra muestran varias señales de IgG alta para seleccionar componentes de la matriz de glicanos oligomanosos para pacientes con COVID-19 en suero en comparación con las señales basales observadas en el suero de donantes de control, y cada punto representa los datos de un paciente individual. Consulte Clave de símbolo en la Figura 1. Ver Figura 6 para pacientes con señales a múltiples glicanos. Estructuras de glicanos creadas con Glicoglifo.⁵⁹

Señales de anticuerpos IgM séricos inusualmente altos para LacNAc y otros autoglicanos en pacientes positivos para SARS-CoV-2

Una estructura común de carbohidratos que se encuentra en muchos glicanos ligados a *N*, glicanos ligados a *O* y glicolípidos es la *N*-acetilactosamina (LacNAc; Gal β 1-4GlcNAc).⁶⁰ LacNAc es abundante en humanos y muchos otros organismos y puede estar presente como una sola unidad, como un oligómero de varias unidades, o como repeticiones poli LacNAc más largas. Debido a que LacNAc es abundante en humanos, se considera un glicano "propio". Varios pacientes con COVID19 mostraron señales de IgM marcadamente altas a LNnO, un glicano que contiene 3 unidades de LacNAc unidas a un residuo de galactosa (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal). La IgM alta a este glicano en pacientes con COVID-19 es especialmente notable dado que la IgM total y la IgM a la mayoría de los otros glicanos fueron mucho más bajas en pacientes con COVID-19. Además, un paciente también tenía una gran señal de IgG a este glicano (Figura 5). Esta señal fue más de 150 veces mayor que la señal más grande a LNnO en el grupo de control. Se detectaron pocas o ninguna señal medible en nuestro grupo de control para IgG o IgM. También se detectaron algunas diferencias para LacNAc y LNnT (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal) (ver Figura 5A y S figura suplementaria S5A). Las señales de anticuerpos a los derivados de LacNAc no se correlacionaron con los títulos de la proteína espiga.

Otros autoglicanos también mostraron altas señales de IgG en pacientes con COVID-19 en comparación con el conjunto de muestras de control. Estos glicanos incluían BG-H1(Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β)y Sialyl Lewis X

(Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4[Fuc α 1-3]GlcNAc) (ver Figura 5B y Figura Suplementaria S5B).

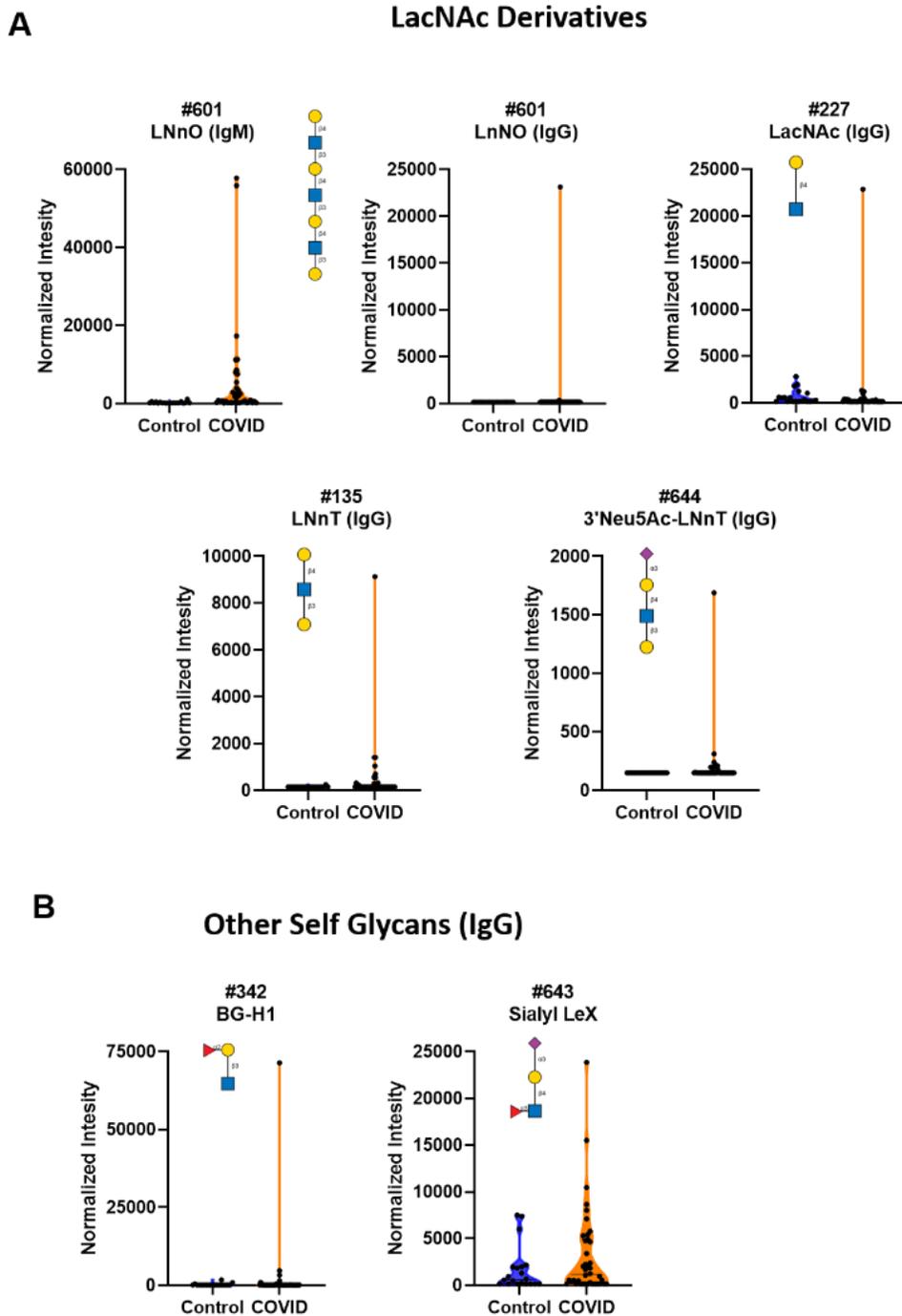


Figura 5. Señales altas de anticuerpos a los autoglicanos en el suero de pacientes con COVID-19. Los gráficos muestran altas señales de IgM e IgG en pacientes con COVID-19 en relación con los donantes de control, y cada punto representa los datos de un paciente individual: **A)** anticuerpos contra los derivados de LacNAc LnNO, LacNAc, LNnT y componentes de la matriz de glicanos de sialil LnNT, **B)** anticuerpos contra otros componentes de la matriz de autoglicanos (BG-H1 y Sialyl LeX). Consulte Clave de símbolo en la Figura 1. Ver Figura 6 para pacientes con señales a múltiples glicanos. Las estructuras de glicanos se crearon utilizando Gliglifo.⁵⁹

Muchos pacientes poseen anticuerpos contra múltiples autoglicanos

La mayoría de los gangliósidos, glicanos ligados a N, glicanos oligomanosos y LNnO discutidos en secciones anteriores se encuentran en humanos y se consideran glicanos " propios ". Para determinar si las señales anormales de anticuerpos contra estos glicanos se extendieron entre los pacientes o se centraron en un pequeño subconjunto, visualizamos los datos en un mapa de calor. Dado que las señales abarcan un amplio rango de valores, optamos por categorizar las señales en relación con el grupo de control para cada componente de glicano. Las señales en el mapa de calor representan valores que son mayores que 6 desviaciones estándar por encima de la media y 10 veces mayores que nuestro valor de piso. Como se puede ver en la Figura 6, ciertos pacientes tenían anticuerpos altos contra múltiples tipos de autoglicanos, mientras que otros no tenían anticuerpos contra ninguno de los autoglicanos. De los 7 pacientes que tenían anticuerpos altos contra al menos un glicano ligado a N, 5 también tenían anticuerpos altos contra uno o más gangliósidos.

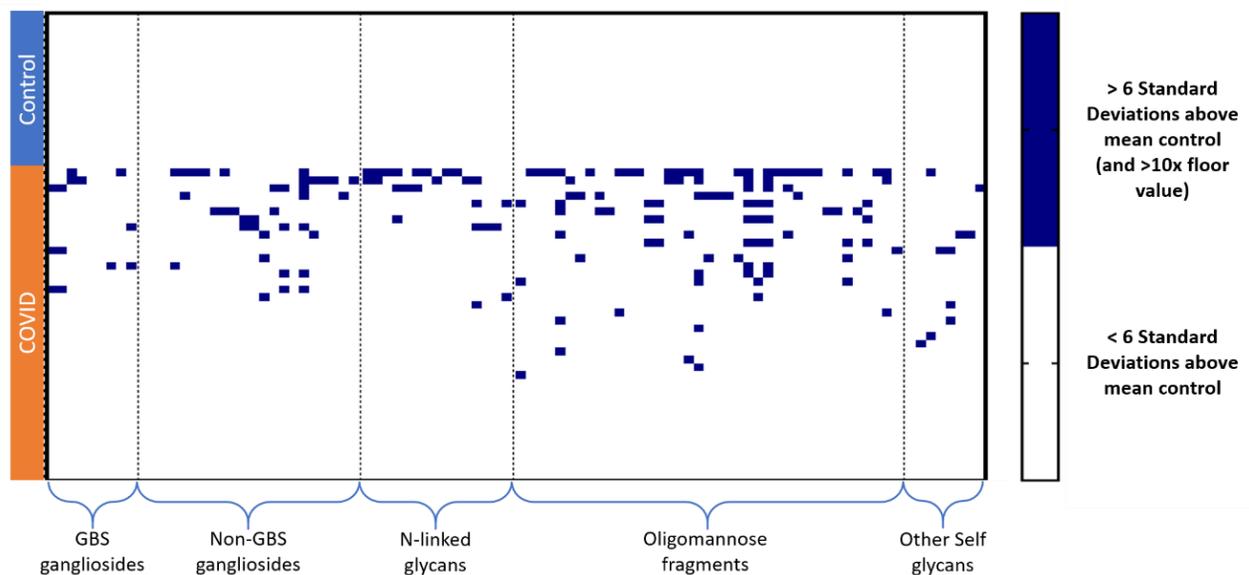


Figura 6. Señales de IgG de control y muestras de suero COVID-19. Cada fila representa un paciente, cada columna representa un glicano. Las filas se agrupan por tipo de paciente, las columnas se agrupan por familias de glicanos. Las cajas de color azul oscuro representan señales que son inusualmente altas (es decir, al menos 6 desviaciones estándar por encima de la media del grupo control y al menos 10 veces más altas que el valor de RFU de piso para nuestro ensayo). Los cuadros blancos representan señales que están por debajo de ese umbral.

IgG inferior a Sialyl Lewis C, Lewis C y GN-Lewis C

Si bien hubo muchas familias de glicanos que tenían señales altas de IgG entre las muestras de pacientes con COVID-19, hubo señales de IgG más bajas para Sialyl Lewis C y Lewis C, y glicanos GN-Lewis C (Figura 7 y Figura S6). Como se puede ver en los gráficos de violín en la Figura 7, los promedios más bajos

para la cohorte COVID-19 fueron impulsados en gran medida por un subconjunto de pacientes con señales muy bajas para estos glicanos.

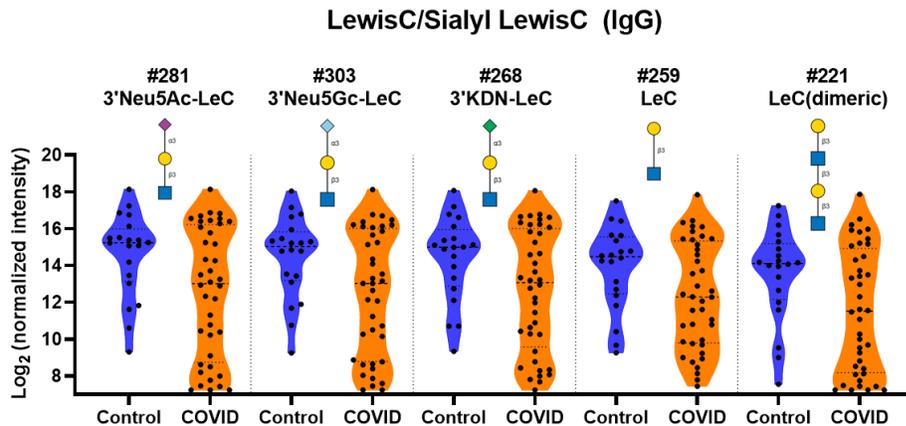


Figura 4. Distribución de señales IgG a derivados de Lewis C. Los gráficos muestran diferencias en la distribución de las señales de IgG Lewis C y los componentes de la matriz de glicanos de Sialyl Lewis C para el suero de pacientes con COVID-19 en comparación con las señales observadas en el suero de donantes de control, y cada punto representa los datos de un paciente individual. Consulte Clave de símbolo en la Figura 1. Las estructuras de glicanos se crearon utilizando Gliglifo.⁵⁹

IgG más alta pero IgM más baja a alfa-Gal y otros glicanos no humanos

Un estudio previo de Urra et al. informó una correlación inversa para los anticuerpos IgG e IgM contra alfaGal[Gal α 1-3Gal β 1-3 (4) GlcNAc] y la gravedad de la enfermedad COVID-19; aquellos con la salida más grave tenían los niveles más bajos de anticuerpos α -Gal.⁴⁵ En su estudio, los pacientes con COVID-19 como grupo tenían niveles de anticuerpos más bajos que los sujetos sanos. Por el contrario, nuestros resultados demostraron una mayor media general α anticuerpos IgG -Gal (Figura 8 y Figura S7). Si bien se detectaron señales más bajas de anticuerpos IgM a α -Gal en muestras de COVID-19, esto podría deberse a los niveles generales más bajos de IgM observados en casi todos los anticuerpos de glicanos.

Las señales de IgG a otros glicanos no humanos, como la α -ramnosa, un péptido modificado con galactosa, un oligosacárido del antígeno d Forssman, también fueron más altas en pacientes con COVID-19 que en los controles (Figura 8 y Figura S7). Las señales promedio para los pacientes con COVID-19 para los componentes de la matriz de manosa α fueron 1.9-2.5 veces más altas que la señal promedio para las muestras de control. Las señales promedio para los pacientes con COVID-19 fueron 1.5-3.7 veces más altas para los diversos componentes de la matriz α -Gal en comparación con la señal de control promedio. La señal promedio para las patentes de COVID-19 a los antígenos de Forssman fue 1.5-4.4 veces más alta que las muestras de control. En el caso del péptido modificado con galactosa, nueve pacientes con COVID-19 tenían señales inusualmente altas en comparación con las muestras de control. No se observaron diferencias en las señales de IgM para estos glicanos.

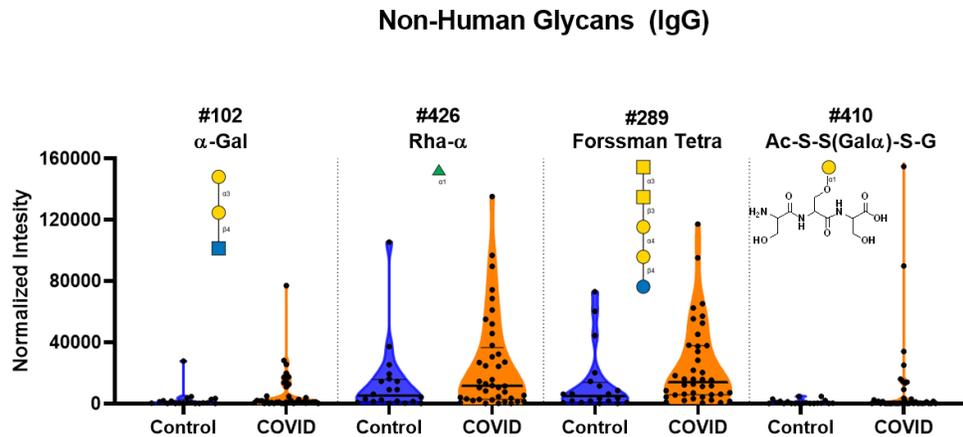


Figura 8. Señales altas de anticuerpos para seleccionar glicanos no humanos en suero de pacientes con COVID-19. Los gráficos muestran altas señales de IgG a α -Gal, α -ramnosa, Forssman y Ac-S-S (Gal α)-S-S-G componentes de la matriz de glicanos no humanos para el suero de pacientes con COVID-19 en comparación con los iguales basales observados en el suero de donantes de control, con cada punto representando datos de un paciente individual. Consulte Clave de símbolo en la Figura 1. Las estructuras de glicanos se crearon utilizando Gliglifo.⁵⁹

IgG e IgM a antígenos del grupo sanguíneo

Ha habido varios estudios que han demostrado una correlación entre el tipo de sangre y la tasa de infección por COVID19.³⁶⁻³⁹ En particular, las personas con el tipo de sangre A tienen una tasa de infección ligeramente más alta que las personas con el tipo de sangre O. Dado que los anticuerpos séricos contra los antígenos del grupo sanguíneo están altamente correlacionados con el tipo de sangre, a continuación examinamos esta familia de anticuerpos. Según los informes de que los individuos del tipo A de sangre tienen tasas de infección más altas, podríamos esperar ver señales de anticuerpos más bajas para los antígenos del grupo sanguíneo A. En cambio, nuestros resultados mostraron anticuerpos IgG más altos contra los antígenos trisacáridos del grupo sanguíneo A y B (Figura 9). Otras variantes de los grupos sanguíneos A y B mostraron tendencias similares (ver Información de apoyo, Figura S8). Debido a la naturaleza relativamente pequeña de nuestro tamaño de muestra y la información incompleta del paciente sobre el tipo de sangre, este nivel más alto de anticuerpos IgG para los grupos sanguíneos A y B podría ser un efecto aleatorio.

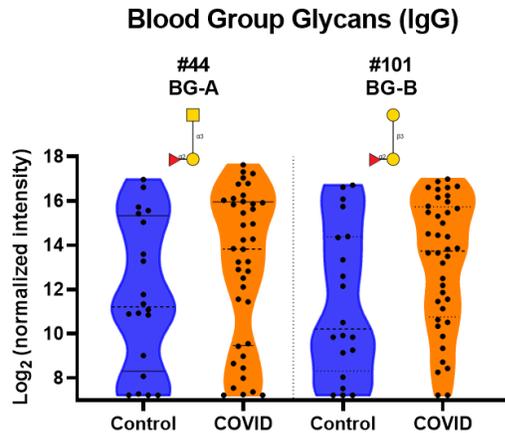


Figura 9. Distribución de señales de IgG a antígenos del grupo sanguíneo. Los gráficos muestran una distribución de señales igG más altas para seleccionar componentes de la matriz de glicanos del grupo sanguíneo A y B para el suero de pacientes con COVID-19 en comparación con las señales observadas desde el suero del donante de control, y cada punto representa los datos de una paciente individual. Ver Clave de símbolo en la Figura 1. Las estructuras de glicanos se crearon utilizando Gliglifo.⁵⁹

Los anticuerpos contra *los glicanos* ligados a N se unen a la proteína espiga del SARS-CoV-2

Los resultados del perfilado de las muestras de suero en la matriz de glicanos nos llevaron a probar varios mAbs para la unión a ambas subunidades y al dominio de unión al receptor (RBD) de la proteína espiga del SARS-CoV-2. Elegimos probar anticuerpos que se sabe que se unen a glicanos oligomanosa y A2 ya que observamos señales inusualmente altas para estos anticuerpos durante la proliferación de la matriz y algunos anticuerpos monoclonales a estos glicanos estaban disponibles. Varios mAbs anti-VIH que se unen a oligomanosa (PGT126 y PGT128) o A2 (PGT121) se ajustan a esta categoría y se probaron utilizando un ensayo ELISA con subunidades S1, S1 RBD y S2 de proteína espiga del SARS-CoV-2 en la placa (ver Figura 10). **PGT128 mostró la mayor unión a las tres construcciones de proteínas espiga que se probaron con valores aparentes de K_D de mejor ajuste de 52, 47 y 57 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (S1, S1 RBD y S2, respectivamente). Tanto PGT126 como PGT121 también se unen a las tres construcciones de proteínas espiga, aunque con una afinidad más débil. Por lo tanto, al menos algunos anticuerpos contra los N-glicanos tienen el potencial de reconocer los glicanos a medida que se presentan en la proteína espiga. Ninguno de los anticuerpos demostró actividad de neutralización (ver Información de apoyo, Figura S9).**

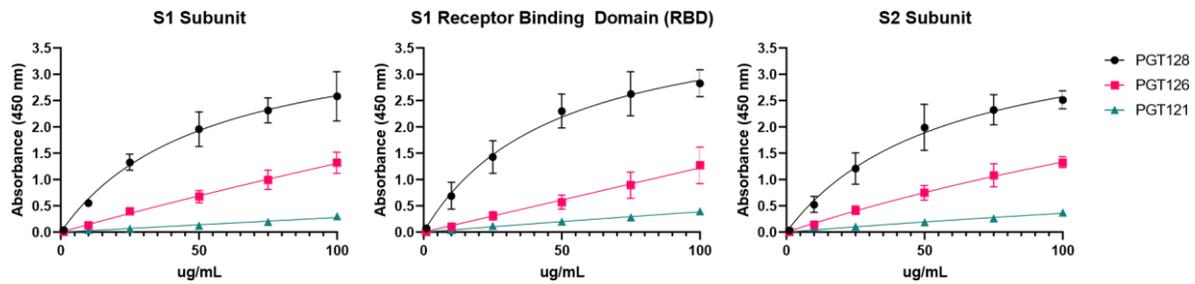


Figura 10. Unión de los mAbs del VIH a fragmentos de proteína espiga del SARS-CoV-2. Curva de dilución ELISA para la unión de los mAbs del VIH PGT128, PGT126 y PGT121 a la subunidad S1 de la proteína espiga del SARS-CoV-2, el dominio de unión al receptor S1 y la subunidad S2. Los datos se muestran como media de 2 réplicas con barras de error que muestran SEM.

Discusión

Comprender las respuestas inmunitarias a la infección por SARS-CoV-2 es fundamental para prevenir y tratar la enfermedad. Por ejemplo, el SARS-CoV-2 puede desencadenar una respuesta inmune demasiado agresiva que conduce a un daño excesivo al paciente, y descubrir este problema ha llevado al uso del agente antiinflamatorio dexametasona como un tratamiento efectivo para COVID-19.²⁸ Si bien hay información considerable al ser reportados sobre diversos aspectos de la respuesta,^{13, 23-25, 43, 44, 61} como cambios en las poblaciones de células inmunes, producción de citoquinas y anticuerpos contra las proteínas, se sabe muy poco sobre la respuesta inmune a los carbohidratos. Dado que la superficie del virus está fuertemente glicosilada, se podrían desencadenar⁴⁹⁻⁵¹ respuestas a los glicanos, lo que contribuye a muchos aspectos de la enfermedad. Además, los anticuerpos preexistentes contra los glicanos podrían reconocer potencialmente el virus encubierto en la progresión de la enfermedad. Para abordar estas posibilidades, utilizamos microradiografía de antígeno de carbohidratos grande para perfilar los repertorios séricos de anticuerpos IgG e IgM antiglicano en pacientes con COVID-19 versus sujetos de control.

Las diferencias más distintivas y notables en los pacientes con COVID-19 en relación con los sujetos de control fueron anticuerpos inusualmente altos contra numerosos carbohidratos propios, incluidos gangliósidos, glicanos ligados a *N*, derivados de LacNAc (LNnO), grupo sanguíneo H1 y sialyl Lewis X. En muchos casos, las señales de anticuerpos observadas en pacientes con COVID-19 fueron más de 20 veces más altas que la señal más grande en el grupo de control. En el caso de LNnO, la mayor señal de paciente con COVID-19 fue 154 veces mayor que la señal de control más alta para ese glicano. Los anti-anticuerpos a un pequeño subconjunto de gangliósidos se han reportado previamente en varios pacientes con COVID-19.^{33, 62, 63} Nuestro estudio proporciona más apoyo a esas observaciones y descubre anticuerpos contra una variedad mucho mayor de gangliósidos / glicolípidos de lo que se informó anteriormente. Además de estos, también informamos muchos anticuerpos anormalmente altos contra los glicanos ligados a *N*, LNnO, grupo sanguíneo H1 y sialyl Lewis X, que no se han informado previamente en pacientes con COVID-19. Tomados en conjunto, nuestros resultados demuestran una respuesta más extensa a los autoglicanos en una proporción mucho mayor de Pacientes con COVID-19 de lo que se conocía anteriormente.

Varias líneas de evidencia indican que los anticuerpos anti-glicanos altos a los auto-glicanos observados en pacientes con COVID-19 son únicos y específicos para la infección. Hemos investigado repertorios de anticuerpos anti-glicanos en numerosas muestras de suero humano anteriormente,

incluyendo más de 200 sujetos sanos y más de 100 pacientes con cáncer antes y después del tratamiento con varias vacunas de cáncer.^{56, 64-68} Según nuestro trabajo previo, los anticuerpos anormalmente altos contra los gangliósidos humanos, los glicanos ligados a *N* y otros autoglicanos son poco comunes. Por ejemplo, no observamos anticuerpos altos contra estos glicanos en $n=100$ pacientes con cáncer antes o después de una vacunación con una vacuna viva atenuada basada en poxvirus (PROSTVAC-VF),^{64, 65} indicando que no se deben a un efecto general de la enfermedad o un efecto no específico de la infección viral. Algunos casos en los que hemos observado anticuerpos altos contra algunos de los glicanos son pacientes infectados por el VIH (anticuerpos contra Man9, GT2 y GT3)⁶⁶ y pacientes con cáncer inmunizados con una vacuna contra el cáncer de células enteras (anticuerpos contra GM2, GM3, Gb5 y sialyl Lewis X).⁶⁷ En estos casos, los anticuerpos contra los autoglicanos estaban presentes en pocos pacientes de urgencias y en menos glicanos que los observados en pacientes con COVID-19. En estudios anteriores, encontramos que los niveles séricos de IgG e IgM para casi todos los glicanos en nuestra matriz son estables en marcos de tiempo de hasta 3 años,^{66, 68} lo que indica que las señales altas en pacientes con certeza no se deben simplemente a una alta variabilidad o fluctuaciones aleatorias a lo largo del tiempo. Por último, nuestros estudios previos en sujetos sanos de diferentes edades indican que estas poblaciones altas en anticuerpos no se deben simplemente al aumento de la edad.⁵⁶

Los anticuerpos contra los autoglicanos podrían ocurrir a través de varios mecanismos posibles. Se sabe que los anticuerpos contra los autoglicanos pueden ser inducidos durante ciertas infecciones virales y bacterianas. Por ejemplo, se han reportado autoanticuerpos contra los glicanos después de infecciones con *C. jejuni*, *M. pneumoniae*, *H. influenzae*, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, virus Zika, chikungunya y VIH.⁶⁹⁻⁷⁶ Un mecanismo para la inducción implica el mimetismo molecular. Ciertos patógenos producen glicanos que son similares a los glicanos humanos. Debido a la similitud en la estructura, estos glicanos pueden desencadenar autoanticuerpos. Otra vía para la inducción de anticuerpos contra los autoglicanos ocurre cuando los patógenos utilizan la maquinaria de glicosilación del huésped para decorar su superficie con glicanos huéspedes. Si bien este proceso es utilizado a menudo por el virus para enmascararse del sistema inmunológico, puede ocurrir una respuesta que conduzca a autoanticuerpos. Un tercer mecanismo para la inducción de anticuerpos contra los autoglicanos ocurre con los virus envueltos. Durante la construcción y el ensamblaje de la envoltura viral, las proteínas glicosiladas del huésped y los glicolípidos del retículo endoplásmico y el Golgi pueden incorporarse a la envoltura junto con las proteínas virales. Cuando esto sucede, las respuestas inmunes al virus pueden incluir anticuerpos contra los autoantígenos en su superficie. Los anticuerpos contra los glicanos en pacientes infectados por SARS-CoV-2 podrían ocurrir a través de los mecanismos dos y / o tres. Estudios previos han demostrado una extensa glicosilación de la proteína espiga con glicanos ligados a *N* y *O*.⁴⁹⁻⁵⁴ Por lo tanto, las respuestas a los glicanos ligados a *N* podrían ser inducidas por la proteína espiga o por glicoproteínas humanas incorporadas a la envoltura. Las respuestas a los gangliósidos/glicolípidos probablemente surgirían a través del tercer mecanismo: el reconocimiento de los glicanos incorporados en la envoltura del SARS-CoV-2.

Los anticuerpos contra los autoglicanos podrían ser clínicamente relevantes por una variedad de razones. Los autoanticuerpos contra los autoglicanos están asociados con una variedad de trastornos autoinmunes.^{57, 76-78} Por ejemplo, los anticuerpos contra los gangliósidos a menudo están relacionados con trastornos neurológicos como el síndrome de Guillain-Barré (GBS) y el síndrome de Miller Fisher. Los gangliósidos se expresan en niveles altos en las células nerviosas, y los anticuerpos contra estos glicanos pueden tener una variedad de efectos, incluida la destrucción de la unión neuromuscular de las células nerviosas y la ruptura de la barrera hematoencefálica y / o la barrera hematoencefálica.^{79, 80} Los gangliósidos también desempeñan funciones en la tolerancia inmune, la transducción de señales y la adhesión celular, y los anticuerpos contra los gangliósidos también pueden interrumpir estos procesos.⁸¹ A partir de una perspectiva clínica, los anticuerpos contra GM1, GD1a, GM1b y GalNAc-GD1a están

relacionados con la neuropatía axonal motora aguda, y los anticuerpos contra GQ1b, GT1a, GD1b y GD3 están asociados con variantes craneales, bulbares y sensoriales de GBS.^{76, 78, 82} Los anticuerpos contra los gangliósidos también se asocian con otras enfermedades como la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis múltiple, la diabetes tipo I, la enfermedad de Crohn, la colitis y la narcolepsia.^{76, 78} Se sabe mucho menos sobre los efectos clínicos de los anticuerpos contra los glicanos ligados a N y otros autoglicanos, pero estos glicanos están presentes en numerosas células del cuerpo humano y podrían servir como autoantígenos.

Nuestro estudio tiene varias implicaciones importantes para el tratamiento y la prevención de COVID-19. Un tratamiento que recientemente se ha otorgado autorización de uso de emergencia es la terapia de plasma convaleciente.^{18, 83} Una variante cercana es la inmunoglobulina intravenosa hiperinmune anti-coronavirus (hIVIG), que recientemente ha entrado en ensayos clínicos de Fase III.⁸⁴ El objetivo de estos enfoques es proporcionar a los pacientes con COVID-19 anticuerpos neutralizantes contra el virus de pacientes que se han recuperado de la enfermedad. Por lo general, el plasma convaleciente solo se examina para detectar un conjunto limitado de características específicas, como títulos de anticuerpos neutralizantes y el resultado de otras enfermedades infecciosas. Si bien estas características son importantes, nuestros resultados (y los resultados de otros) indican que la detección de posibles autoanticuerpos puede ser útil para minimizar las posibles complicaciones. Por ejemplo, uno puede querer examinar el plasma para detectar la presencia / ausencia de anticuerpos contra los gangliósidos, glicanos ligados a N y otros autoglicanos discutidos anteriormente para garantizar que los pacientes que reciben plasma convaleciente no estén *siendo* infundidos con anticuerpos contra estos autoglicanos.

Además del tratamiento, también existe una necesidad urgente de desarrollar una vacuna segura y eficaz contra el SARS-CoV-2. Actualmente, hay numerosas vacunas en desarrollo que utilizan una variedad de estrategias para iniciar respuestas inmunes al SARS-CoV-2. Las principales medidas de éxito son la reducción de las tasas de infección y el desarrollo de anticuerpos neutralizantes. Es posible que algunas de las vacunas puedan inducir autoanticuerpos en subgrupos de pacientes. Nuestros resultados, combinados con los resultados de otros estudios,²⁹⁻³⁴ indican que las vacunas de autoanticuerpos son una complicación potencial y que las vacunas deben diseñarse para minimizar la producción potencial de autoanticuerpos. Factores como el método de producción y el tipo de vacuna pueden ser críticos. Por ejemplo, es probable que el virus vivo atenuado o el virus inactivado aún muestren una compleja variedad de autoglicanos para el sistema inmunológico, lo que brinda la oportunidad de generar anticuerpos contra los autoglicanos. Independientemente del tipo de vacuna, la evaluación de la producción de posibles autoanticuerpos contra los glicanos, así como las proteínas, debe ser parte del proceso de evaluación.

Los resultados de este estudio pueden ayudar a explicar algunos de los síntomas inusuales en pacientes con COVID-19, así como proporcionar información para desarrollar y elegir tratamientos. Una proporción sustancial de los pacientes con COVID-19 experimentan síntomas neurológicos, como disminución del sentido del olfato, dolores de cabeza, dolor muscular y espasmos, así como delirio, encefalopatía séptica y accidente cerebrovascular isquémico.^{85, 86} Estos síntomas no parecen ser causados por la infección por SARS-CoV-2 en el cerebro, ya que el virus está ausente en la mayoría de las muestras de líquido cefalorraquídeo.³¹ Una variedad de otros síntomas en pacientes con COVID-19 no se explican fácilmente por la infección directa del órgano o las células afectadas. Muchos de los síntomas de COVID-19, especialmente los síntomas prolongados en "covid prolongado", se asemejan a trastornos autoinmunes, y los autoanticuerpos podrían ser mediadores clave de estos síntomas.³¹ Además de nuestro estudio centrado en los anticuerpos contra los autoglicanos, otros estudios han demostrado autoanticuerpos contra una variedad de proteínas en pacientes adultos con síntomas graves de COVID-19 o síntomas neurológicos.^{30, 31} Comprender las funciones potenciales de los autoanticuerpos puede conducir a mejores tratamientos. Por ejemplo, el síndrome de Guillain-Barré a menudo se trata con inmunoglobulina intravenosa (IGIV). Los pacientes con COVID-19 con anticuerpos altos contra varios

gangliósidos, y posiblemente otros autoglicanos, también podrían beneficiarse de la IGIV. Se necesitarán estudios adicionales para evaluar esta hipótesis.

Nuestro estudio ilustra aún más cómo los síntomas del paciente y las respuestas inmunes a la infección por SARS-CoV-2 pueden variar ampliamente. Mientras que algunos pacientes tienen complicaciones neurológicas y otros síntomas asociados con los autoanticuerpos, otros tienen síntomas mucho más leves. En nuestro estudio, los síntomas de los pacientes eran desconocidos, pero algunos pacientes tenían respuestas amplias a los autoglicanos, mientras que otros no tenían ninguno. Por ejemplo, cinco de los pacientes con COVID-19 representaron más de la mitad de todas las señales inusualmente altas de anticuerpos contra los autoglicanos. Este resultado es consistente con un modelo en el que la tolerancia se rompe en ciertos pacientes, lo que lleva a la producción generalizada de autoanticuerpos a una variedad de autoantígenos.

Más allá de los autoglicanos, observamos diferencias sustanciales entre los pacientes con COVID-19 y los sujetos de control para una variedad de otros glicanos, incluidos Lewis C / Sialyl Lewis C, ramnosa, el antígeno de Forssman y un glicopéptido con galactosa α vinculado a un residuo de serina. Todavía no está claro por qué habría diferencias en los anticuerpos contra estos glicanos. Las infecciones secundarias son una posibilidad, pero se estudiarán más estudios para comprender mejor la base de estas diferencias.

Cabe mencionar varias limitaciones de este estudio. Primero, nuestro microradiografía de glicanos solo contiene una pequeña porción de los glicanos que se encuentran en el glicoma humano. Por lo tanto, puede haber otras poblaciones importantes de anticuerpos antiglicanos que no se detectaron. En segundo lugar, nuestro estudio incluyó una cohorte relativamente pequeña de 40 pacientes con COVID-19 y 20 controles sanos. En otros trabajos, hemos perfilado anticuerpos anti-glicanos séricos en cientos de sujetos sanos, por lo que nuestra base de repertorios de anticuerpos normales se basa en una experiencia considerable.^{56, 87} En contraste, estos son los primeros 40 pacientes con COVID-19 que hemos evaluado, y las pruebas adicionales serán útiles para investigar más a fondo los hallazgos de este estudio. No se disponía de información sobre los síntomas y el resultado de los pacientes. En consecuencia, se necesitarán estudios de seguimiento para evaluar las posibles correlaciones entre los síntomas y los repertorios de anticuerpos antiglicanos. Actualmente se están realizando estudios adicionales para abordar estas limitaciones.

Por último, nuestro estudio destaca la importancia de estudiar las respuestas inmunes a los carbohidratos. Los glicanos son una de las principales familias de antígenos que se encuentran en el SARS-CoV-2 y otros virus, pero las respuestas a estos antígenos a menudo son difíciles de estudiar. Al perfilar los anticuerpos séricos con un microradiografía de antígenos de carbohidratos grandes y diversos, pudimos identificar rápidamente anticuerpos anormalmente altos contra una variedad de autoglicanos. Estos resultados proporcionan una nueva visión de la respuesta inmune a SARS-CoV-2 e ilustran la importancia de estudiar anticuerpos para alojar antígenos además de antígenos virales. Los resultados también destacan los factores / preocupaciones clave para el desarrollo de vacunas y tratamientos para COVID-19 y proporcionan una comprensión más completa de los riesgos asociados con la infección por SARS-CoV-2, que es fundamental para tomar decisiones de salud informadas.

Materiales y métodos

Muestras de suero

Disponibles públicamente, se compraron muestras de suero no identificadas de 40 personas con infecciones por SARS-CoV-2 y 10 donantes sanos de RayBiotech, Inc. (Peachtree Corners, GA). Estas muestras se recolectaron in situ en múltiples ubicaciones de RayBiotech dentro de los Estados Unidos. Todos los pacientes que se indicaron infectados con SARS-CoV-2 fueron sintomáticos. Se obtuvieron diez muestras adicionales de suero de donantes sanos de Valley Biomedical Products and Services (Winchester, VA). Todas las muestras no COVID-19 se recogieron antes de la pandemia de SARS-CoV-2. Among las muestras COVID-19 positivas, 10 fueron IgM positivas, 10 fueron IgG positivo y 20 no se especificaron como IgM o IgG positivos. El suero de referencia se agerró a partir de 10 muestras compradas en Valley Biomedical Products and Services. Las muestras se almacenaron a -70 °C antes de su uso.

Fabricación y ensayo de microarrays

Los microarrays de glicanos se fabricaron como se describió anteriormente.^{88, 89} El microarray contenía 816 componentes de matriz e incluía una variedad de glicanos humanos (glicanos ligados a *N*, glicanos ligados a *O* y porciones de glicolípidos de glicolípidos), glicanos no humanos, glicopéptidos y glicoproteínas. Cada componente de la matriz se imprimió por duplicado para producir una matriz completa, y se imprimieron 8 copias de la matriz completa en cada diapositiva. Antes de cada experiencia, cada diapositiva de microarray se escaneaba en un escáner de fluorescencia InnoScan 1100 AL para verificar si había defectos y puntos de impresión faltantes. Las correderas fueron equipadas con un módulo de 8 pozos

(Sigma-Aldrich) para permitir 8 ensayos independientes en cada diapositiva. En el ensayo, los arrays se bloquearon con BSA al 3% en el tampón PBS (400 µL/pozo) durante la noche a 4 °C, luego se lavaron seis veces con tampón PBST (PBS con 0,05% v/v Tween 20). Se agregaron muestras de suero diluidas a 1:50 en BSA al 3% y HSA al 1% en PBST en cada diapositiva

(100 µL/pozo). Para minimizar variaciones técnicas, todas las muestras se ensayaron por duplicado en diapositivas separadas.

Después de la agitación a 100 rpm durante 4 horas a 37 °C, los portaobjetos se lavaron seis veces con PBST (200 µL/polo). Los anticuerpos séricos unidos se detectaron incubando con Cy3 anti-IgG humana y DyLight 647 IgM antihumana (Jackson ImmunoResearch) a 3 µg/mL en tampón PBS con 3% de BSA y 1% de HSA (100 µL/pozo) bajo agitación a 37 °C durante 2 horas. Las diapositivas se cubrieron con papel de aluminio para evitar el fotobleaching. Después del lavado con PBST eight veces (200 µL/pozo), las diapositivas se retiraron de los módulos y se remojaron en PBST durante 5 min antes de secarse por centrifugación a 1000 rpm (112 × *g*) durante 10 minutos. Las diapositivas se escanearon con un InnoScan 1100 AL (Innopsys) a una resolución de 5 µm. Los ajustes del tubo fotomultiplicador (PMT) fueron los mismos para todos los experimentos para limitar la variación involuntaria de la señal. Las diapositivas se escanearon en Ajustes de PMT "alto" y "bajo" (para el láser de 532 nm, alto pmt = 5 y bajo = 1; para el láser de 635 nm, alto = 25 y bajo = 9) para aumentar el rango dinámico y los componentes adecuadamente saturados de escala. La intensidad de fluorescencia de cada punto de la matriz se cuantificó con el software GenePix Pro 7 (Molecular Devices). Cualquier característica marcada como faltante o defectuosa en el preescaneo se excluyó de un análisis posterior. Se utilizó la mediana corregida de fondo local para el análisis de los

datos, y las manchas con intensidad inferior a 150 RFU (1/2 del fondo típico de IgM) se establecieron en 150. Las señales para los puntos de réplica en pozos duplicados se promediaron y se transformaron en logaritmos (base 2) para futuros análisis. Los datos completos de microarrays se pueden encontrar en el archivo de Excel compatible.

Ensayo ELISA

La proteína de subunidad S1 del SARS-CoV-2 (RBD) recombinante (Raybiotech, Inc.), la proteína de subunidad S1 recombinante del SARS-CoV-2 (longitud completa)(RayBiotech, Inc.) o la proteína de subunidad recombinante del SARS-CoV-2 S2 (longitud completa) (RayBiotech, Inc.) se enchaparon a 5 µg/ml en tampón PBS, pH 7.4 en los pozos deseados de unaplaca ELISA transparente y de fondo plano de 96 pozos(ThermoFisher Scientific, Nunc MaxiSorp™). Lasplacas se cubrieron con una lámina adhesiva y se almacenaron a 4 ° C durante la noche. Las placas se vaciaron y lavaron cuatro veces con tampón PBS (200 µL/pozo). Las placas se bloquearon con BSA al 3% en tampón PBS (100 µL/pozo) durante 2 horas a temperatura ambiente. La placas se lavó cuatro veces con tampón PBS (200 µL/pozo). Cada una de las existencias de anticuerpos (PGT121, PGT126, PGT128, NIH AIDS Reagent Program) se diluyó a 100 µg/ml diluido 5 veces en BSA al 1% en tampón PBS. Se añadieron soluciones de anticuerpos a la placa (50 µL/polo) y se incubaron a 37°C durante 2 horas con agitación suave. Las placas se vaciaron y lavaron seis veces con tampón PBS (200 µL/pozo). Una solución de afinidad peroxidasa cabra pura anti-humana IgG (dilución 1:2500, JacksonImmuno) en BSA al 1% en tampón PBS se added a cada pozo (50 µL/pozo) y se incubó a 37°C durante 2 horas con agitación suave. Las placas se vaciaron y lavaron seis veces con tampón PBS (200 µL/pozo). Después de lavar las placas, se agregó sustrato TMB ELISA (50 µL/pozo, alta sensibilidad, abCam) a cada pozo y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de agregar una solución de parada (50 µL/pozo, 2M H₂SO₄) a cada pozo. La absorbancia a 450 nm se leyó utilizando una BioTek Biosynergy 2.

Agradecimientos

Agradecemos al Consorcio de Glucómica Funcional (GM62116; El Instituto de Investigación Scripps), X. Huang (Universidad Estatal de Michigan), T. Tolbert (Universidad de Kansas), Lai-Xi Wang (Universidad de Maryland), J. Barchi (Instituto Nacional del Cáncer), T. Lowary (Universidadde Alberta), Beat Ernst (Universidad de Basilea), Omicron Biochemicals Inc., GlycoHub y Glycan Therapeutics por contribuir generosamente con glicanos para la matriz. Los siguientes reactivos se obtuvieron a través del Programa de Reactivos contra el SIDA de los NIH, División de AIDS, NIAID, NIH: Anti-HIV-1 gp120 Monoclonal (PGT121) de IAVI (cat# 12343); Anti-VIH-1 gp120 Monoclonal (PGT126) de IAVI (cat# 12344); Anti-VIH-1

gp120 Monoclonal (PGT128) de IAVI.^{90, 91} Este trabajo fue apoyado por el Programa de Investigación Intramuros del Instituto Nacional del Cáncer, NIH.

Referencias

1. Zhou, Y.; Stix, G., COVID-19 es ahora la tercera causa principal de muerte en el U.S. *Scientific American* 2020.
2. Pezzini, A.; Padovani, A., Levantando la máscara sobre las manifestaciones neurológicas de COVID-19. *Nat Rev Neurol* 2020.
3. Zubair, A.S.; McAlpine, L. S.; Gardin, T.; Farhadian, S.; Kuruvilla, D. E.; Spudich, S., Neuropathogenesis and Neurologic Manifestations of the Coronaviruses in the Age of Coronavirus Disease 2019: A Review. *JAMA Neurol* 2020, 77 (8), 1018-1027.
4. Koralnik, I. J.; Tyler, K. L., COVID-19: Una amenaza global para el sistema nervioso. *Ann Neurol* 2020, 88 (1), 1-11.
5. Chen, X.; Laurent, S.; Onur, O. A.; Kleineberg, N. N.; Fink, G. R.; Schweitzer, F.; Warnke, C., Una revisión sistemática de los síntomas neurológicos y las complicaciones de COVID-19. *J Neurol* 2020, 111.
6. Puntmann, V. O.; Carerj, M. L.; Wieters, I.; Fahim, M.; Arendt, C.; Hoffmann, J.; Shchendrygina, A.; Escher, F.; Vasa-Nicotera, M.; Zeiher, A.M.; Vehreschild, M.; Nagel, E., Resultados de la resonancia magnética cardiovascular en pacientes recuperados de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19). *JAMA Cardiol* 2020.
7. Pérez-Bermejo, J.A.; Kang, S.; Rockwood, S. J.; Simoneau, C. R.; Alegría, D. A.; Ramadoss, G. N.; Silva, A.C.; Flanigan, W. R.; Li, H.; Nakamura, K.; Whitman, J. D.; Ott, M.; Conklin, B. R.; McDevitt, T.C., la infección por SARS-CoV-2 de células cardíacas humanas derivadas de iPSC predice nuevas características clínicas en corazones de pacientes con COVID-19. *bioRxiv* 2020, 2020.08.25.265561.
8. Ramachandran, P.; Onukogu, I.; Ghanta, S.; Gajendran, M.; Perisetti, A.; Goyal, H.; Aggarwal, A., Síntomas y resultados gastrointestinales en pacientes hospitalizados con enfermedad por coronavirus 2019. *Dig Dis* 2020, 38 (5), 373-379.
9. Villapol, S., Síntomas gastrointestinales asociados a COVID-19: impacto en el microbioma intestinal. *Transl Res* 2020, S1931-5244(20)30199-7.

10. Davido, B.; Seang,S.; Tubiana, R.; de Truchis, P., Síntomas crónicos post-COVID-19: ¿una entidad postinfecciosa? *Clin Microbiol Infectar*.
11. Carfi, A.; Bernabei,R.; Landi, F.; por el Gemelli En Contra, C.-P.-A. C. S. G., Síntomas persistentes en pacientes después de COVID-19 agudo. *JAMA* **2020**, *324* (6), 603-605.
12. Weerahandi, H.; Hochman,K. A.; Simón, E.; Blaum, C.; Chodosh, J.; Duan, E.; Garry, K.; Kahan,T.; Karmen-Tuohy, S.; Karpel, H.; Mendoza, F.; Prete, A.M.; Quintana, L.; Rutishauser, J.; Santos Martínez, L.; Shah, K.; Sharma, S.; Simón, E.; Stirniman, A.; Horwitz, L., Estado de salud y síntomas posteriores al alta en pacientes con COVID-19 grave. *medRxiv* **2020**, 2020.08.11.20172742.
13. Xiang, F.; Wang,X.; Él, X.; Peng, Z.; Yang, B.; Zhang, J.; Zhou, Q.; Ye, H.; Ma, Y.; Li, H.; Wei, X.; Cai, P.; Ma, W.-L., Detección de anticuerpos y características dinámicas en pacientes con COVID-19. *Clin Infect Dis* **2020**, ciaa461.
14. Xie, J.; Ding,C.; Li, J.; Wang, Y.; Guo, H.; Lu, Z.; Wang, J.; Zheng, C.; Jin, T.; Gao, Y.; He, H., Características de los pacientes con enfermedad por coronavirus (COVID-19) confirmadas mediante una prueba de anticuerpos IgM-IgG. *J Med Virol* **2020**, 10.1002/jmv.25930.
15. Theel, E. S.; Slev,P.; Wheeler, S.; Couturier, M. R.; Wong, S. J.; Kadkhoda, K., El papel de las pruebas de anticuerpos para el SARS-CoV-2: ¿Hay uno? *J Clin Microbiol* **2020**, *58* (8), e00797-20.
16. Shen, C.; Wang,Z.; Zhao, F.; Yang, Y.; Li, J.; Yuan, J.; Wang, F.; Li, D.; Yang, M.; Xing, L.; Wei, J.; Xiao,H.; Yang, Y.; Qu, J.; Qing, L.; Chen, L.; Xu, Z.; Peng, L.; Li, Y.; Zheng, H.; Chen, F.; Huang, K.; Jiang, Y.; Liu, D.; Zhang, Z.; Liu, Y.; Liu, L., Tratamiento de 5 pacientes con covid-19 con plasma con convaleciente. *JAMA* **2020**, *323* (16), 1582-1589.
17. Duan, K.; Liu,B.; Li, C.; Zhang, H.; Yu, T.; Qu, J.; Zhou, M.; Chen, L.; Meng, S.; Hu, Y.; Peng, C.; Yuan,M.; Huang, J.; Wang, Z.; Yu, J.; Gao, X.; Wang, D.; Yu, X.; Li, L.; Zhang, J.; Wu, X.; Li, B.; Xu,Y.; Chen, W.; Peng, Y.; Hu, Y.; Lin, L.; Liu, X.; Huang, S.; Zhou, Z.; Zhang, L.; Wang, Y.; Zhang,Z.; Deng, K.; Xia, Z.; Gong, Q.; Zhang, W.; Zheng, X.; Liu, Y.; Yang, H.; Zhou, D.; Yu, D.; Hou, J.; Shi, Z.; Chen, S.; Chen, Z.; Zhang, X.; Yang, X., Efectividad de la terapia con plasma convaleciente en pacientes graves con COVID-19. *Proc Natl Acad Sci USA* **2020**, *117* (17), 9490-9496.
18. Joyner, M.J.; Senefeld,J. W.; Klassen, S. A.; Mills, J. R.; Johnson, P. W.; Theel, E. S.; Wiggins, C.C.; Bruno, K. A.; Klompas, A.M.; Lesser, E. R.; Kunze, K. L.; Sexton, M. A.; Díaz Soto, J.C. ; Baker, S. E.; Pastor, J. R. A.; Van Helmond, N.; van Buskirk, C.M.; Winters, J. L.; Stubbs, J. R.; Rea,R. F.; Hodge, D. O.; Herasevich, V.; Whelan, E. R.; Clayburn, A. J.; Larson, K. F.; Ripoll, J. G.; Andersen,K. J.; Buras, M. R.; Vogt, M. N. P.; Dennis, J. J.; Regimbal, R. J.; Bauer, P. R.; Blair, J. E.; Paneth, N. S.; Fairweather, D.; Wright, R. S.; Carter, R. E.; Casadevall, A., Efecto del plasma convaleciente en la mortalidad entre pacientes hospitalizados con COVID-19: experiencia inicial de tres meses. *medRxiv* **2020**, 2020.08.12.20169359.
19. Joyner, M.J.; Wright,R. S.; Fairweather, D.; Senefeld, J. W.; Bruno, K. A.; Klassen, S. A.; Carter, R. E.; Klompas, A.M.; Wiggins, C.C.; Shepherd, J. R. A.; Rea, R. F.; Whelan, E. R.;

- Clayburn, A.J.; Spiegel, M. R.; Johnson, P. W.; Lesser, E. R.; Baker, S. E.; Larson, K. F.; Ripoll, J. G.; Andersen, K. J.; Hodge, D. O.; Kunze, K. L.; Buras, M. R.; Vogt, M. N. P.; Herasevich, V.; Dennis, J. J.; Regimbal, R. J.; Bauer, P. R.; Blair, J. E.; Van Buskirk, C.M.; Winters, J. L.; Stubbs, J. R.; Paneth, N. S.; Verdún, N.C.; Marcos, P.; Casadevall, A., Indicadores de seguridad tempranos de plasma convalescente de COVID-19 en 5000 pacientes. *J Clin Invest* **2020**, *130* (9), 4791-4797.
20. Un estudio de LY3819253 (LY-CoV555) en la prevención de la infección por SARS-CoV-2 y COVID-19 en residentes y personal de hogares de ancianos. identificador de ClinicalTrials.gov: NCT04497987.
 21. Estudio que evalúa la eficacia y la seguridad de los anticuerpos monoclonales anti-pico contra el SARS CoV-2 para la prevención de la infección por SARS CoV-2 asintomática en adultos sanos que son contactos domésticos con un individuo con un ensayo positivo de RT-PCR del SARS-CoV-2. ClinicalTrials.gov identificador: NCT04452318.
 22. Seguridad, tolerabilidad, y eficacia de los anticuerpos monoclonales anti-Spike (S) SARS-CoV-2 para el tratamiento de pacientes adultos ambulatorios con COVID-19. identificador de ClinicalTrials.gov: NCT04425629.
 23. Shah, V.K.; Fimal, P.; Alam, A.; Ganguly, D.; Chattopadhyay, S., Descripción general de la respuesta de inmunidad durante la infección por SARS-CoV-2: lecciones del pasado. *Frente Immunol* **2020**, *11*, 1949.
 24. Shi, Y.; Wang, Y.; Shao, C.; Huang, J.; Gan, J.; Huang, X.; Bucci, E.; Piacentini, M.; Hipólito, G.; Melino, G., Infección por COVID-19: las perspectivas sobre las respuestas inmunes. *Cell Death Differ* **2020**, *27* (5), 1451-1454.
 25. Mathew, D.; Giles, J. R.; Baxter, A. E.; Oldridge, D. A.; Greenplate, A. R.; Wu, J. E.; Alanio, C.; Kuri-Cervantes, L.; Pampena, M.B.; D'Andrea, K.; Manne, S.; Chen, Z.; Huang, Y. J.; Reilly, J. P.; Weisman, A. R.; Ittner, C. A. G.; Kuthuru, O.; Dougherty, J.; Nzingha, K.; Han, N.; Kim, J.; Pattekar, A.; Goodwin, E.C.; Anderson, E.M.; Weirick, M. E.; Gouma, S.; Arévalo, C. P.; Bolton, M. J.; Chen, F.; Lacey, S. F.; Ramage, H.; Cereza, S.; Hensley, S. E.; Apostolidis, S. A.; Huang, A.C.; Vella, L. A.; Betts, M. R.; Meyer, Nueva Jersey; Wherry, E. J., Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. *Ciencia* **2020**, *369* (6508), eabc8511.
 26. Gallelli, L.; Zhang, L.; Wang, T.; Fu, F., Lesión pulmonar aguda grave relacionada con la infección por COVID-19: una revisión y el posible papel de la escina. *J Clin Pharmacol* **2020**, *60* (7), 815-825.
 27. José, R. J.; Manuel, A., Tormenta de citoquinas COVID-19: la interacción entre la inflamación y la coagulación. *Lancet Respir Med* **2020**, *8* (6), e46-e47.
 28. Horby, P.; Lim, W. S.; Emberson, J.; Mafham, M.; Bell, J.; Linsell, L.; Staplin, N.; Brightling, C.; Ustianowski, A.; Elmahi, E.; Prudon, B.; Verde, C.; Felton, T.; Chadwick, D.; Rege, K.; Fegan,

- C.; Chappell, L.C.; Fausto, S. N.; Jaki, T.; Jeffery, K.; Montgomery, A.; Rowan, K.; Juszczak, E.; Baillie, J. K.; Haynes, R.; Landray, M. J., Efecto de la dexametasona en pacientes hospitalizados con COVID-19: Informe preliminar. *medRxiv* **2020**, 2020.06.22.20137273.
29. Gruber, C.; Patel, R. S.; Trachtman, R.; Lepow, L.; Amanat, F.; Krammer, F.; Wilson, K.M.; Onel, K.; Geanon, D.; Tuballes, K.; Patel, M.; Mouskas, K.; O'Donnell, T.; Merritt, E.; Simons, N.; Barcessat, V.; Del Valle, D.M.; Udondem, S.; Kang, G.; Gangadharan, S.; Ofori-Amanfo, G.; Laserson, U.; Rahman, A.; Kim-Schulze, S.; Charney, A.; Gnjatic, S.; Gelb, B. D.; Merad, M.; Bogunovic, D., Mapeo de la inflamación sistémica y las respuestas de anticuerpos en el síndrome inflamatorio multisistémico en niños (MIS-C). *Celda* **2020**.
30. Bastardo, P.; Rosen, L.B.; Zhang, P.; Michailidis, E.; Hoffmann, H.-H.; Zhang, Y.; Dorgham, K.; Philippot, P.; Rosaín, J.; Béziat, V.; Manry, J.; Shaw, E.; Haljasmägi, L.; Peterson, P.; Lorenzo, L.; Bizien, L.; Trouillet-Assant, S.; Dobbs, K.; de Jesús, A. A.; Belot, A.; Kallaste, A.; Catherinot, E.; Tandjaoui-Lambiotte, Y.; Le Pen, J.; Kerner, G.; Bigio, B.; Seeleuthner, Y.; Yang, R.; Bolze, A.; Spaan, A. N.; Delmonte, O.M.; Abers, M. S.; Aiuti, A.; Casari, G.; Lampasona, V.; Piemonti, L.; Ciceri, F.; Bilguvar, K.; Lifton, R. P.; Jarrón, M.; Smadja, D.M.; Migaud, M.; Hadjadj, J.; Terrier, B.; Duffy, D.; Quintana-Murci, L.; van de Beek, D.; Roussel, L.; Vinh, D.C.; Tangye, S. G.; Haerynck, F.; Dalmau, D.; Martínez-Picado, J.; Brodin, P.; Nussenzweig, M.C.; Boisson-Dupuis, S.; Rodríguez-Gallego, C.; Vogt, G.; Mogensen, T. H.; Oler, A. J.; Gu, J.; Burbelo, P. D.; Cohen, J.; Biondi, A.; Bettini, L. R.; Angio, M.; Bonfanti, P.; Rossignol, P.; Mayaux, J.; Rieux-Laucat, F.; Husebye, E. S.; Fusco, F.; Ursini, M. V.; Imberti, L.; Sottini, A.; Paghera, S.; Quirós-Roldán, E.; Rossi, C.; Castagnoli, R.; Montagna, D.; Licari, A.; Marseglia, G. L.; Duval, X.; Ghosn, J.; Tsang, J. S.; Goldbach-Mansky, R.; Kisand, K.; Lionakis, M. S.; Puel, A.; Zhang, S.-Y.; Holanda, S.M.; Gorochov, G.; Jouanguy, E.; Arroz, C.M.; Cobat, A.; Notarangelo, L. D.; Abel, L.; Su, H.C.; Casanova, J.-L., Autoanticuerpos contra IFN tipo I en pacientes con COVID-19 potencialmente mortal. *Ciencia* **2020**, eabd4585.
31. Franke, C.; Ferse, C.; Kreye, J.; Reincke, M.; Sánchez-Sendín, E.; Rocco, A.; Steinbrenner, M.; Angermair, S.; Treskatsch, S.; Zickler, D.; Eckardt, K.-U.; Dersch, R.; Hosp, J.; Audebert, H. J.; Endres, M.; Ploner, C. J.; Pruess, H., Alta frecuencia de autoanticuerpos del líquido cefalorraquídeo en pacientes con COVID-19 con síntomas neurológicos. *medRxiv* **2020**, 2020.07.01.20143214.
32. Casciola-Rosen, L.; Thiemann, D. R.; Andrade, F.; Trejo Zambrano, M. I.; Hooper, J. E.; Leonard, E.; Spangler, J.; Cox, A. L.; Machamer, C.; Sauer, L.; Laeyendecker, O.; Garibaldi, B. T.; Ray, S.C.; Mecoli, C.; Christopher-Stine, L.; Gutiérrez-Alamillo, L.; Yang, Q.; Hines, D.; Clarke, W.; Rothman, R. E.; Pekosz, A.; Fenstermacher, K.; Wang, Z.; Zeger, S. L.; Rosen, A., Los autoanticuerpos IgM que reconocen ACE2 están asociados con COVID-19 grave. *medRxiv* **2020**, 2020.10.13.20211664.
33. Civardi, C.; Collini, A.; Geda, D. J.; Geda, C., Antigangliosido antibodies en el síndrome de Guillain-Barré asociado a la infección por SARS-CoV-2. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **2020**, jnnp-2020324279.
34. Abu-Rumeileh, S.; Abdelhak, A.; Foschi, M.; Tumani, H.; Otto, M., Espectro del síndrome de Guillain-Barré asociado a COVID-19: una revisión sistemática actualizada de 73 casos. *J Neurol* **2020**, 1-38.

35. Kulkarni, R., Mejora dependiente de anticuerpos de las infecciones virales. *Dinámica de la Activación Inmune en Enfermedades Virales* **2019**,9-41.
36. Latz, C.A.; DeCarlo,C.; Boitano, L.; Png, C. Y.M.; Patell, R.; Conrad, M. F.; Eagleton, M.; Dua, A., Tipo de sangre y resultados en pacientes con COVID-19. *Ann Hematol* **2020**, *99* (9), 2113-2118.
37. Zhao, J.; Yang,Y.; Huang, H.; Li, D.; Gu, D.; Lu, X.; Zhang, Z.; Liu, L.; Liu, T.; Liu, Y.; Él, Y.; Sol, B.; Wei, M.; Yang, G.; Wang, X.; Zhang, L.; Zhou, X.; Xing, M.; Wang, P. G., Relación entre el grupo sanguíneo ABO y la susceptibilidad a COVID-19. *medRxiv* **2020**, 2020.03.11.20031096.
38. Zietz, M.; Tatonetti, N. P., Prueba de la asociación entre el tipo de sangre y la infección por COVID-19, la intubación y la muerte. *medRxiv* **2020**, 2020.04.08.20058073.
39. Dzik, S.; Eliason,K.; Morris, E.B.; Kaufman, R.M.; Grupos sanguíneos North, C.M., COVID-19 y ABO. *Transfusión* **2020**, *60* (8), 1883-1884.
40. Kuri-Cervantes, L. ; Pampena,M.B.; Meng, W.; Rosenfeld, A.M.; Ittner, C. A. G.; Weisman, A. R.; Agyekum,R.; Mathew, D.; Baxter, A. E.; Vella, L.; Kuthuru, O.; Apostolidis, S.; Bershaw, L.; Dougherty, J.; Greenplate,A. R.; Pattekar, A.; Kim,J.; Han, N.; Gouma, S.; Weirick, M. E.; Arévalo, C. P.; Bolton,M. J.; Goodwin, E.C.; Anderson, E.M.; Hensley, S. E.; Jones, T. K.; Mangalmurti, N. S.; Luning Prak, E. T.; Wherry, E. J.; Meyer, Nueva Jersey; Betts, M. R., Immunologic perturbations in severe COVID-19/SARS-CoV-2 infection. *bioRxiv* **2020**, 2020.05.18.101717.
41. Gudbjartsson, D.F.; Norddahl,G. L.; Melsted, P.; Gunnarsdottir, K.; Holm, H.; Eythorsson, E.; Arnthorsson, A. O.; Helgason, D.; Bjarnadottir, K.; Ingvarsson, R. F.; Thorsteinsdottir, B.; Kristjansdottir, S.; Birgisdottir,K.; Kristinsdottir, A.M.; Sigurdsson, M. I.; Arnadottir, G. A.; Ivarsdottir, E. V.; Andresdottir,M.; Jonsson, F.; Agustsdottir, A.B.; Berglund, J.; Eiriksdottir, B.; Fridriksdottir, R.; Gardarsdottir, E. E.; Gottfredsson, M.; Gretarsdottir, O. S.; Gudmundsdottir, S.; Gudmundsson,K. R.; Gunnarsdottir, T. R.; Gylfason, A.; Helgason, A.; Jensson, B. O.; Jonasdottir, A.; Jonsson,H.; Kristjansson, T.; Kristinsson, K. G.; Magnusdottir, D. N.; Magnusson, O. T.; Olafsdottir,L.B.; Rognvaldsson, S.; le Roux, L.; Sigmundsdottir, G.; Sigurdsson, A. ; Sveinbjornsson,G.; Sveinsdottir, K. E.; Sveinsdottir, M.; Thorarensen, E. A.; Thorbjornsson, B.; Thordardottir,M.; Saemundsdottir, J.; Kristjansson, S. H.; Josefsdottir, K. S.; Masson, G.; Georgsson,G.; Kristjansson, M.; Moller, A.; Palsson, R.; Gudnason, T.; Thorsteinsdottir, Estados Unidos; Jonsdottir, I.; Sulem, P.; Stefansson, K., Respuesta inmune humoral al SARS-CoV-2 en Islandia. *N Engl J Med* **2020**.
42. Tay, M.Z.; Poh,C.M.; Rénia, L.; MacAry, P. A.; Ng, L. F. P., La trinidad de COVID-19: inmunidad, inflamación e intervención. *Nat Rev Immunol* **2020**, *20* (6), 363-374.
43. Hueston, L.; Kok,J.; Guibone, A.; McDonald, D.; Hone, G.; Goodwin, J.; Carter, I.; Basile, K.; Sandaradura, I.; Maddocks, S.; Sintchenko, V.; Gilroy, N.; Chen, S.; Dwyer, D. E.; O'Sullivan, M. V. N., La respuesta de anticuerpos a la infección por SARS-CoV-2. *Open Forum Infect Dis* **2020**, *7* (9).
44. Del Valle, D.M.; Kim-Schulze, S.; Huang, H.-H.; Beckmann, S. D.; Nirenberg, S.; Wang, B.;

- Lavín, Y.; Swartz, T. H.; Madduri, D.; Stock, A.; Marron, T. U.; Xie, H.; Patel, M.; Tuballes, K.; Van Oekelen, O.; Rahman, A.; Kovatch, P.; Aberg, J. A.; Schadt, E.; Jagannath, S.; Mazumdar, M.; Charney, A. W.; Firpo-Betancourt, A.; Mendu, D. R.; Jhang, J.; Reich, D.; Sigel, K.; CordonCardo, C.; Feldmann, M.; Parekh, S.; Merad, M.; Gnjatic, S., Una firma de citoquinas inflamatorias predice la gravedad y la supervivencia de COVID-19. *Nat Med* **2020**.
45. Urra, J.M.; Ferreras-Colino, E.; Contreras, M.; Cabrera, C.M.; Fernández de Mera, I. G.; Villar, M.; Cabezas-Cruz, A.; Gortázar, C.; de la Fuente, J., La respuesta de la hormiga al glicano α -Gal se correlaciona con los síntomas de la enfermedad COVID-19. *bioRxiv* **2020**, 2020.07.14.201954.
46. Yilmaz, B.; Portugal, S.; Tran, Tuan M.; Gozzelino, R.; Ramos, S.; Gomes, J.; Regalado, A.; Cowan, Pedro J.; d'Apice, Anthony J. F.; Chong, Anita S.; Doumbo, Ogobara K.; Traore, B.; Crompton, Pedro D.; Silveira, H.; Soares, Miguel P., Gut Microbiota Elicits a Protective Immune Response against Malaria Transmission. *Celda* **2014**, *159* (6), 1277-1289.
47. Galili, U., Evolución en primates s por "Catastrófica-selección" interacción entre epidemias de virus envueltos, genes mutados de enzimas que sintetizan antígenos de carbohidratos y anticuerpos anticarbohidratos naturales. *Am J Phys Anthropol* **2019**, *168* (2), 352-363.
48. Pacheco, I.; Contreras, M.; Villar, M.; Risalde, M. A.; Alberdi, P.; Cabezas-Cruz, A.; Gortázar, C.; de la Fuente, J., La vacunación con alfa-gal protege contra la infección por micobacteria en el modelo de tuberculosis del pez cebra. *Vacunas (Basilea)* **2020**, *8* (2), 195.
49. Shajahan, A.; Supekar, N. T.; Gleinich, A. S.; Azadi, P., Deduciendo el perfil de glicosilación N y O de la proteína espiga del nuevo coronavirus SARS-CoV-2. *Biología de la glicobiología* **2020**.
50. Watanabe, Y.; Allen, J. D.; Wrapp, D.; McLellan, J. S.; Crispin, M., Análisis de glicanos específicos del sitio del pico de SARS-CoV-2. *Ciencia* **2020**, *369* (6501), 330.
51. Zhang, Y.; Zhao, W.; Mao, Y.; Chen, Y.; Wang, S.; Zhong, Y.; Su, T.; Gong, M.; Du, D.; Lu, X.; Cheng, J.; Yang, H., Caracterización de la N-glicosilación específica del sitio de las proteínas de espiga recombinantes del SARS-CoV-2. *bioRxiv* **2020**, 2020.03.28.013276.
52. Zhao, P.; Praissman, J. L.; Grant, O. C.; Cai, Y.; Xiao, T.; Rosenbalm, K. E.; Aoki, K.; Kellman, B. P.; Bridger, R.; Barouch, D. H.; Brindley, M. A.; Lewis, N. E.; Tiemeyer, M.; Chen, B.; Woods, R. J.; Wells, L., Interacciones virus-receptor del pico cosido de GlySars-CoV-2 y del receptor humano ACE2. *Cell Host Microbe* **2020**, *28* (4), 586-601.e6.
53. Casalino, L.; Gaieb, Z.; Orfebvre, J. A.; Hjorth, C. K.; Dommer, A. C.; Harbison, A. M.; Fogarty, C. A.; Barros, E. P.; Taylor, B. C.; McLellan, J. S.; Fadda, E.; Amaro, R. E., Beyond Shielding: The Roles of Glycans in the SARS-CoV-2 Spike Protein. *ACS Cent Sci* **2020**.
54. Woo, H.; Parque, S.-J.; Choi, Y. K.; Parque, T.; Tanveer, M.; Cao, Y.; Kern, N. R.; Lee, J.; Yeom, M. S.; Croll, T. I.; Seok, C.; Im, W., Developing a Fully Glycosylated Full-Length SARS-CoV-2 Spike Protein Model in a Viral Membrane. *J Phys Chem B* **2020**, *124* (33), 7128-7137.
55. Acharya, P.; Williams, W.; Henderson, R.; Janowska, K.; Manne, K.; Parques, R.; Deyton, M.; Spreng, J.; Platea, V.; Kopp, M.; Mansouri, K.; Edwards, R. J.; Meyerhoff, R. R.; Oguín, T.; Sempowski, G.; Saunders, K.; Haynes, B. F., Un grupo de glicanos en el ectodominio del pico del

- SARS-CoV-2 es reconocido por los anticuerpos reactivos a glicanos dimerizados por Fab. *bioRxiv* **2020**,2020.06.30.178897.
56. Muthana, S.M.; Gildersleeve, J.C., Factores que afectan los repertorios de IgG e IgM antiglicano en suero humano. *Sci Rep* **2016**, *6* (1), 19509.
 57. Lardone, R. D.; Irazoqui, F. J.; Nores, G. A., La mayoría de los anticuerpos igG antiglicolípidos asociados a trastornos neurológicos ocurren sin su contraparte IgM. *J Biomed Sci* **2019**, *26* (1), 67.
 58. Varki, A., Roles biológicos de los glicanos. *Glicobiología* **2017**, *27* (1), 3-49.
 59. Mehta, A. Y.; Cummings, R. D., GlycoGlyph: una aplicación de visualización, dibujo y nomenclatura de glicanos. *Bioinformática* **2020**, *36* (11), 3613-3614.
 60. Stanley, P.; Cummings, R. D., Estructuras comunes a diferentes glicanos. En *Essentials of Glicobiología*, Varki, A. ; Cummings, R. D.; Esko, J. D.; Stanley, P.; Hart, G. W.; Aebi, M.; Darvill, A. G.; Kinoshita, T.; Packer, N. H.; Prestegard, J. H.; Schnaar, R. L.; Seeberger, P. H., Eds. Frío Prensa de laboratorio de Spring Harbor. Copyright 2015-2017 por The Consortium of Glycobiology Editores, La Jolla, California. Todos los derechos reservados.: Cold Spring Harbor (NY), 2015; págs. 161-78.
 61. Tang, Y.; Liu, J.; Zhang, D.; Xu, Z.; Ji, J.; Wen, C., Tormenta de citoquinas en COVID-19: la evidencia actual y las estrategias de tratamiento. *Front Immunol* **2020**, *11*, 1708-1708.
 62. Gutiérrez-Ortiz, C.; Méndez-Guerrero, A.; Rodrigo-Rey, S.; San Pedro-Murillo, E.; Bermejo-Guerrero, L.; Gordo-Mañas, R.; de Aragón-Gómez, F.; Benito-León, J., Síndrome de Miller Fisher y polineuritis craneal en COVID-19. *Neurología* **2020**, *95* (5), e601.
 63. Guilmot, A.; Maldonado Sloop, S.; Sellimi, A.; Bronchain, M.; Hanseeuw, B.; Belkhir, L.; Yombi, J.C.; De Greef, J.; Pothén, L.; Yildiz, H.; Duprez, T.; Fillée, C.; Anantharajah, A.; Cabos, A.; Hantson, P.; Jacquerye, P.; Raymackers, J.-M.; Londres, F.; El Sankari, S.; Ivanoiu, A.; Maggi, P.; van Pesch, V., Síndromes neurológicos inmunomeditados en pacientes infectados por SARS-CoV-2. *J Neurol* **2020**, 1-7.
 64. Campbell, C.T.; Gulley, J. L.; Oyelaran, O.; Hodge, J. W.; Schlom, J.; Gildersleeve, J.C., La respuesta humoral a un glicano viral se correlaciona con la supervivencia en PROSTVAC-VF. *Proc Natl Acad Sci USA* **2014**, *111* (17), E1749-E1758.
 65. Campbell, C.T.; Gulley, J. L.; Oyelaran, O.; Hodge, J. W.; Schlom, J.; Gildersleeve, J.C., Los anticuerpos séricos contra el grupo sanguíneo A predicen la supervivencia en PROSTVAC-VF. *Clin Cancer Res* **2013**, *19* (5), 1290-9.
 66. Scheepers, C.; Chowdhury, S.; Wright, W. S.; Campbell, C. T.; Garrett, Nueva Jersey; Abdool Karim, Q.; Abdool Karim, S. S.; Moore, P. L.; Gildersleeve, J.C.; Morris, L., Anticuerpos IgG de unión a glicanos séricos en la infección por VIH-1 y durante el desarrollo de respuestas ampliamente neutralizantes. *SIDA* **2017**, *31* (16), 2199-2209.

67. Xia, L.; Schrump, D. S.; Gildersleeve, J.C., Las vacunas contra el cáncer de células enteras inducen grandes respuestas de anticuerpos a los carbohidratos y glicoproteínas. *Cell Chem Biol* **2016**, *23* (12), 1515-1525.
68. Durbin, S. V.; Wright, W. S.; Gildersleeve, J.C., Development of a Multiplex Glycan Microarray Assay and Comparative Analysis of Human Serum Anti-Glycan IgA, IgG, and IgM Repertoires. *ACS Omega* **2018**, *3* (12), 16882-16891.
69. Tam, C.C.; O'Brien, S. J.; Petersen, I.; Islam, A.; Hayward, A.; Rodrigues, L.C., Síndrome de Guillain-Barré e infección anterior con campylobacter, influenza y virus de Epstein-Barr en la base de datos de investigación de práctica general. *PloS one* **2007**, *2* (4), e344-e344.
70. Jacobs, B.C.; Rothbarth, P. H.; van der Meché, F. G.; Herbrink, P.; Schmitz, P. I.; de Klerk, M. A.; van Doorn, P. A., The spectrum of antecedent infections in Guillain-Barré syndrome: a casecontrol study. *Neurología* **1998**, *51* (4), 1110-5.
71. Ju, Y. Y.; Womersley, H.; Pritchard, J.; Gray, I.; Hughes, R. A.; Gregson, N. A., Haemophilus influenzae como posible causa del síndrome de Guillain-Barré. *J Neuroimmunol* **2004**, *149* (1-2), 160-6.
72. Ang, C. W.; Tío-Gillen, A. P.; Groen, J.; Herbrink, P.; Jacobs, B.C.; Van Koningsveld, R.; Osterhaus, A. D.; Van der Meché, F. G.; van Doorn, P. A., Anticuerpos anti-galactocerebrósidos de reactividad cruzada en infecciones por Myco plasma pneumoniae en el síndrome de Guillain-Barré. *J Neuroimmunol* **2002**, *130* (1-2), 179-83.
73. do Rosário, M.S.; de Jesús, P. A. P.; Vasilakis, N.; Farías, D. S.; Novaes, M. A.C.; Rodrigues, S. G.; Martins, L.C.; Vasconcelos, P. F. d.C.; Ko, A. I.; Alcântara, L.C. J.; de Siqueira, I.C., Síndrome de Guillain-Barré después de la infección por el virus del Zika en Brasil. *Am J Trop Med Hyg* **2016**, *95* (5), 1157-1160.
74. Uncini, A.; Shahrizaila, N.; Kuwabara, S., Infección por el virus del Zika y síndrome de Guillain-Barré: una respuesta centrada en los subtipos clínicos y electrofisiológicos. *Revista de Neurología, Neurocirugía & Psiquiatría* **2017**, *88* (3), 266.
75. Lebrun, G.; Chadda, K.; Reboux, A.-H.; Martinet, O.; Gaüzère, B.-A., Síndrome de Guillain-Barré después de la infección por chikungunya. *Emerg Infect Dis* **2009**, *15* (3), 495-496.
76. Cutillo, G.; Saariaho, A.-H.; Meri, S., Fisiología de los gangliósidos y el papel de los anticuerpos antigangliósidos en las enfermedades humanas. *Cell Mol Immunol* **2020**, *17* (4), 313-322.
77. Gleeson, P. A., Glicoconjugados en la autoinmunidad. *Biochim Biophys Acta Gene Struct Expression* **1994**, *1197* (3), 237-255.
78. Nores, G.A.; Lardona, R. D.; Comín, R.; Alaniz, M. E.; Moyano, A. L.; Irazoqui, F. J., Anticuerpos anti-GM1 como modelo de la respuesta inmune a los autoglicanos. *Biochim Biophys Acta, Chem Subj* **2008**, *1780* (3), 538-545.

79. Plomp, J. J.; Willison, H. J., Acciones fisiopatológicas de los anticuerpos anti-gangliósidos relacionados con la neuropatía en la unión neuromuscular. *J Physiol* **2009**, *587* (Pt 16), 3979-3999.
80. Kaida, K.; Ariga, T.; Yu, R. K., Anticuerpos antigangliosidos y sus efectos fisiopatológicos en el síndrome de Guillain-Barré y trastornos relacionados—Una revisión. *Glicobiología* **2009**, *19* (7), 676-692.
81. Yu, R. K.; Tsai, Y.-T.; Ariga, T.; Yanagisawa, M., Estructuras, biosíntesis y funciones de los gangliósidos: una visión general. *J Oleo Sci* **2011**, *60* (10), 537-544.
82. Willison, H. J.; Yuki, N., Neuropatías periféricas y anticuerpos antiglicolípidos. *Cerebro* **2002**, *125* (Pt 12), 2591-625.
83. Liu, S. T.H.; Lin, H.-M.; Baine, I.; Wajnberg, A.; Gumprecht, J. P.; Rahman, F.; Rodríguez, D.; Tandon, P.; Bassily-Marcus, A.; Bander, J.; Sanky, C.; Dupper, A.; Zheng, A.; Nguyen, F. T.; Amanat, F.; Stadlbauer, D.; Altman, D. R.; Chen, B. K.; Krammer, F.; Mendu, R. D.; Firpo-Betancourt, A.; Levin, M. A.; Bagiella, E.; Casadevall, A.; Cordón-Cardo, C.; Jhang, J. S.; Arinsburg, S. A.; Reich, D. L.; Aberg, J. A.; Bouvier, N.M., Tratamiento con plasma convalescente de COVID-19 grave: una puntuación de propensión—estudio de control emparejado. *Nat Med* **2020**.
84. Tratamiento hospitalario con inmunoglobulina anti-coronavirus (ITAC). identificador de ClinicalTrials.gov: NCT04546581.
85. Yavarpour-Bali, H.; Ghasemi-Kasman, M., Actualización sobre las manifestaciones neurológicas de COVID-19. *Vida Sci* **2020**, *257*, 118063-118063.
86. Orsucci, D.; Ienco, E.C.; Nocita, G.; Napolitano, A.; Vista, M., Características neurológicas de COVID-19 y su tratamiento: una revisión. *Contexto de drogas* **2020**, *9*, 2020-5-1.
87. Oyelaran, O.; McShane, L.M.; Dodd, L.; Gildersleeve, J.C., Perfilando anticuerpos séricos humanos con un microarray de antígeno de carbohidratos. *J Proteome Res* **2009**, *8* (9), 4301-4310.
88. Campbell, C.T.; Zhang, Y.; Gildersleeve, J.C., Construcción y uso de microarrays de glicanos. *Curr Protoc Chem Biol* **2010**, *2* (1), 37-53.
89. Xia, L.; Gildersleeve, J.C., The Glycan Array Platform as a Tool to Identify Carbohydrate Antigens. En *Carbohydrate-Based Vaccines: Methods and Protocols*, Lepenies, B., Ed. Springer New York: New York, NY, 2015; pp 27-40.
90. Walker, L.M.; Huber, M.; Puertas, K. J.; Falkowska, E.; Pejchal, R.; Julien, J.-P.; Wang, S.-K.; Ramos, A.; Chan-Hui, P.-Y.; Moyle, M.; Mitcham, J. L.; Hammond, P. W.; Olsen, O. A.; Phung, P.; Fling, S.; Wong, C.-H.; Phogat, S.; Wrin, T.; Simek, M. D.; Investigadores Principales, P. G.; Koff, W.C.; Wilson, I. A.; Burton, R. D.; Pognard, P., Amplia cobertura de neutralización del VIH por múltiples anticuerpos altamente potentes. *Nature* **2011**, *477* (7365), 466-470.

91. Pejchal, R.; Puertas, K. J.; Walker, L.M.; Khayat, R.; Huang, P.-S.; Wang, S.-K.; Stanfield, R. L.; Julien, J.-P.; Ramos, A.; Crispín, M.; Depetris, R.; Katpally, Estados Unidos; Marozsan, A.; Cupo, A.; Maloveste, S.; Liu, Y.; McBride, R.; Ito, Y.; Sanders, R. W.; Ogohara, C.; Paulson, J.C.; Feizi, T.; Scanlan, C. N.; Wong, C.-H.; Moore, J. P.; Olson, W.C.; Ward, A.B.; Poignard, P.; Schief, W. R.; Burton, R. D.; Wilson, I. A., Un anticuerpo neutralizante potente y amplio reconoce y penetra en el escudo de glicanos del VIH. *Ciencia (Nueva York, Nueva York)* **2011**, 334 (6059), 1097-1103.